

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Dane LUŽNIK

POGOSTNOST KOLONIZACIJE Z BAKTERIJO
Streptococcus pneumoniae **IN MOŽNOSTI ZA**
IZBOLJŠANJE DIAGNOSTIKE PNEVMOKOKNIH
OKUŽB DIHAL
DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Dane Lužnik

**POGOSTNOST KOLONIZACIJE Z BAKTERIJO *Streptococcus pneumoniae* IN MOŽNOSTI ZA IZBOLJŠANJE DIAGNOSTIKE
PNEVMOKOKNIH OKUŽB DIHAL
DOKTORSKA DISERTACIJA**

**FREQUENCY OF COLONIZATION WITH *Streptococcus pneumoniae*
AND POSSIBILITIES TO IMPROVE THE DIAGNOSIS OF
PNEUMOCOCCAL RESPIRATORY TRACT INFECTIONS
DOCTORAL DISSERTATION**

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 11. 2. 2014 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicina, področje mikrobiologije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Mitja Košnik, dr. med., spec. interne medicine in za somentorico doc. dr. Viktorija Tomič, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicina s področja mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik, v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo.

Mentor: prof. dr. Mitja Košnik, dr. med., spec. interne medicine

Somentorica: doc. dr. Viktorija Tomič, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja SEME, dr. med., spec. klin. mikrobiol.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Manica MUELLER - PREMUR, dr. med., spec. klin. mikrobiol.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Blaž STRES, univ. dipl. mikrobiol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 20. 04. 2016

Podpisani izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na Univerzo v Ljubljani neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu prek Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Dane Lužnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
 DK UDK 579.61:616.24-078:579.862(043)=163.6
 KG klinična mikrobiologija/zunajbolnišnična pljučnica/kronična obstruktivna pljučna bolezen/*Streptococcus pneumoniae*/mikrobiološka diagnostika/kultivacija/molekularne tehnike
 AV LUŽNIK, Dane, univ. dipl. mikr.
 SA KOŠNIK, Mitja (mentor) / TOMIČ, Viktorija (somentorica)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicina, področje mikrobiologije
 LI 2016
 IN POGOSTNOST KOLONIZACIJE Z BAKTERIJO *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* IN MOŽNOSTI ZA IZBOLJŠANJE DIAGNOSTIKE PNEVMOKOKNIH OKUŽB DIHAL
 TD Doktorska disertacija
 OP XI, 99 str., 18 pregl., 13 sl., 4 pril., 103 vir.
 IJ SI
 JI sl/en
 AI Okužbe spodnjih dihal so vodilni vzrok obolevnosti in pomemben vzrok smrtnosti po celem svetu. Najpogostejši povzročitelj je *Streptococcus pneumoniae*. Postavitev diagnoze pnevmokokne pljučnice z uporabo klasičnih mikrobioloških tehnik je zahtevna, saj metoda izolacije bakterije iz krvi ni dovolj občutljiva, kultivacija iz izmečka lahko predstavlja kolonizacijo, invazivne metode odvzema vzorca pa se izvajajo le redko. Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti pogostost *S. pneumoniae* pri treh skupinah bolnikov, hospitaliziranih na Kliniki Golnik. Zbrali smo respiratorne in urinske vzorce 106 bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico, 55 bolnikov z akutni poslabšanjem kronične obstruktivne pljučne bolezni (apKOPB) in 159 bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni. Izvedli smo kultivacijo respiratornih kužnin. Iz porasle kulture respiratornih vzorcev smo izvedli hibridizacijski test AccuProbe *S. pneumoniae*. Vsem respiratornim vzorcem smo izolirali DNK in iz izolatov DNK izvedli in-house hkratni PCR ter in-house PCR v realnem času, specifična za *S. pneumoniae*. Urinske vzorce smo testirali s testom BinaxNOW za zaznavanje topnega pnevmokoknega antigena. Testirali smo 320 vzorcev z vsemi petimi metodami in glede na metodo dobili od 19 (6,3 %) do 51 (15,9 %) pozitivnih rezultatov. Metoda z največ pozitivnimi rezultati je bila PCR v realnem času. S kombinacijo različnih metod za dokazovanje pnevmokokov smo ugotovili pogostost bakterije *S. pneumoniae* v posamezni skupini bolnikov. Pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi zunajbolnišnične pljučnice, smo možnost pnevmokokne pljučnice odkrili pri 40 (37,7 %) bolnikih. V skupini bolnikov z apKOPB smo odkrili 8 (14,6 %), v skupini bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih, pa 29 (18,2 %) bolnikov, koloniziranih z bakterijo *S. pneumoniae*. Med deležem bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, in deležem bolnikov z apKOPB, ki so kolonizirani s *S. pneumoniae*, nismo odkrili statistično pomembne razlike. S kombinacijo različnih metod smo dobili višje število pozitivnih vzorcev kot s katerokoli posamezno metodo. Test BinaxNOW za zaznavanje pnevmokoknega urinskega antigena se je pokazal kot možna metoda za ločevanje med pnevmokokno okužbo in pnevmokokno kolonizacijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 579.61:616.24-078:579.862(043)=163.6
- CX clinical microbiology/community acquired pneumonia/chronic obstructive pulmonary disease/*Streptococcus pneumoniae*/microbiological diagnostics/cultivation/molecular techniques
- AU LUŽNIK, Dane
- AA KOŠNIK, Mitja (supervisor) / TOMIČ, Viktorija (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Field Microbiology
- PY 2016
- TI FREQUENCY OF COLONIZATION WITH *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* AND POSSIBILITIES TO IMPROVE THE DIAGNOSIS OF PNEUMOCOCCAL RESPIRATORY TRACT INFECTIONS
- DT Doctoral dissertation
- NO XI, 99 p., 18 tab., 13 fig., 4 ann., 103 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Lower respiratory tract infections are the leading cause of morbidity and a significant cause of mortality worldwide. The most common cause of lower respiratory tract infections is *Streptococcus pneumoniae*. Diagnosis of pneumococcal pneumonia using conventional microbiological techniques is difficult, because the isolation of bacteria from blood is not sensitive enough, the cultivation of sputum may represent colonization, and invasive methods of specimen collection are carried out only rarely. Our study was conducted to determine the frequency of *S. pneumoniae* in three groups of patients hospitalized at the University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik. Respiratory and urine samples were collected from 106 patients with community acquired pneumonia, 55 patients with AE COPD, and 159 patients who were hospitalized due to non-infectious reasons. All respiratory samples were cultivated on blood agar plates. Cultures of respiratory samples were also tested with the Genprobe AccuProbe test which is a hybridization test. DNA was isolated from all respiratory samples. In-house real-time PCR and in-house multiplex PCR, both specific to *S. pneumoniae*, were carried out from DNA isolates. Urine samples were tested with the BinaxNOW *S. pneumoniae* urinary antigen test. While testing all 320 samples with different methods, we detected between 19 (6.3%) and 51 (15.9%) positive results, depending on the method. The method with the most positive results was real-time PCR. The frequency of *S. pneumoniae* in each group of hospitalized patients was determined with combined results of all five methods. 37.7% of samples of patients with CAP, 14.6% of samples from patients with COPD and 18.2% of samples from patients hospitalized due to non-infectious reasons were positive for *S. pneumoniae*. Statistical analysis showed that the difference between the last two groups was statistically insignificant. The combined results of different methods delivered more positive results than those of each individual method. The BinaxNOW test has high specificity. An indicated possibility to differentiate between pneumococcal infection and colonisation should be verified in a further study.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN	2
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 EVOLUCIJA <i>S. pneumoniae</i>	4
2.2 VIRULENČNI DEJAVNIKI	5
2.2.1 Kapsula in celična stena	5
2.2.2 Pnevmozin	7
2.2.3 Avtozolin	8
2.2.4 Pnevmozni površinski protein A	8
2.2.5 Hialuronatna liaza	9
2.2.6 Pnevmozni površinski antigen A	10
2.2.7 Holin vezavni protein A	10
2.2.8 Nevraminidaza	11
2.3 CEPIVO	11
2.4 PROTEINI IN CEPIVA	13
2.5 <i>S. pneumoniae</i> IN OKUŽBE PRI LJUDEH	15
2.6 <i>S. pneumoniae</i> KOT DEL MIKROBIOTE ZGORNJIH DIHAL	16
2.7 KOLONIZACIJA V NOSNEM DELU ŽRELA	17
2.8 PREHOD IZ KOLONIZACIJE DO PLJUČNICE IN INVAZIVNE BOLEZNI	18
2.9 RAZVOJ PLJUČNICE (IMUNOLOGIJA)	19
2.10 BAKTERIEMIJA, PROTITELESA IN VLOGA VRANICE	20
2.11 VLOGA CITOKINOV	21
2.12 KRONIČNA OBSTRUKTIVNA PLJUČNA BOLEZEN (KOPB)	22
2.13 LABORATORIJSKA DIAGNOZA	23
2.13.1 Mikroskopski pregled kužnin	24
2.13.2 Kultivacija in identifikacija	25
2.13.3 Hemokulture	26
2.13.4 Testi za dokazovanje antigenov	27
2.13.5 Testi za zaznavanje protiteles	28
2.13.6 Testi pomnoževanja nukleinskih kislin	29
2.13.7 Masna spektrometrija	30

2.13.8 Biomarkerji	31
3 MATERIAL IN METODE	33
3.1 BOLNIKI IN ODVZEM KUŽNIN	33
3.2 KULTIVACIJA RESPIRATORNIH KUŽNIN	33
3.3 IDENTIFIKACIJSKI TEST AccuProbe <i>Streptococcus pneumoniae</i>	34
3.4 TEST BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i>	34
3.5 HEMOKULTURE	35
3.6 PCR ZA DOKAZ <i>S. pneumoniae</i> NEPOSREDNO V KUŽNINI	35
3.6.1 Izolacija DNK	35
3.6.2 In-house hkratni PCR	36
3.6.3 In-house PCR v realnem času	37
3.7 BAKTERIJSKI SEVI	38
3.8 BAKTERIJSKA SUSPENZIJA	39
3.9 STATISTIČNA OBDELAVA	39
4 REZULTATI	41
4.1 BOLNIKI	41
4.2 KULTIVACIJA VZORCEV IZ SPODNJIH DIHAL	41
4.3 IDENTIFIKACIJSKI TEST AccuProbe <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
4.4 BinaxNOW <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
4.5 IN-HOUSE HKRATNI PCR	43
4.6 IN-HOUSE PCR V REALNEM ČASU	44
4.7 HEMOKULTURE	44
4.8 OPTIMIZACIJA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO	44
4.8.1 Testiranje analitične specifičnosti dveh protokolov PCR	44
4.8.2 Ugotavljanje spodnje meje zaznave tarčne DNK z verižno reakcijo s polimerazo	45
4.9 UJEMANJE METOD	46
4.9.1 Vsi bolniki	46
4.9.2 Bolniki z diagnozo pljučnica	49
4.9.3 Bolniki z diagnozo apKOPB	51
4.9.4 Bolniki, hospitalizirani zaradi drugih bolezni	53
4.10 PRIMERJAVA METOD	55
4.10.1 Primerjava metod po skupinah bolnikov	55
4.11 KOMBINACIJA METOD	57
4.12 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST	60
4.12.1 Občutljivost	60
4.12.2 Specifičnost	63
5 RAZPRAVA	66
5.1 BinaxNOW <i>Streptococcus pneumoniae</i>	67
5.2 KULTIVACIJA RESPIRATORNIH KUŽNIN	70
5.3 HEMOKULTURE	73
5.4 IDENTIFIKACIJSKI TEST AccuProbe <i>Streptococcus pneumoniae</i>	73

5.5 IN-HOUSE HKRATNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO.....	75
5.6 IN-HOUSE VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	77
5.7 KOMBINACIJA METOD	79
5.8 KOLONIZACIJA Z BAKTERIJO <i>S. pneumoniae</i>	82
6 SKLEPI	84
7 POVZETEK	85
7.1 SUMMARY	87
8 VIRI	89
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v verižni reakciji s polimerazo	36
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi in fluorescenčno označeni sonde, uporabljeni v verižni reakciji s polimerazo v realnem času.....	37
Preglednica 3: Rast <i>S. pneumoniae</i> iz respiratornih kužnin	42
Preglednica 4: Rezultati identifikacijskega testa AccuProbe <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
Preglednica 5: Rezultati testa BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i>	43
Preglednica 6: Rezultati in-house hkratnega PCR-testa.....	43
Preglednica 7: Rezultati in-house qPCR-testa.....	44
Preglednica 8: Rezultati testiranja specifičnosti hkratnega PCR in PCR v realnem času	45
Preglednica 9: Primerjava rezultatov kultivacije respiratornih vzorcev z rezultati testov AccuProbe, BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i> in obema PCR-testoma.....	48
Preglednica 10: Primerjava rezultatov kultivacije respiratornih vzorcev bolnikov s pljučnico z rezultati testov AccuProbe, BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i> in obema PCR-testoma	50
Preglednica 11: Primerjava rezultatov kultivacije respiratornih vzorcev bolnikov z apKOPB z rezultati testov AccuProbe, BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i> in obema PCR-testoma	52
Preglednica 12: Primerjava rezultatov kultivacije respiratornih vzorcev bolnikov, hospitaliziranih zaradi neinfektivnih razlogov, z rezultati testov AccuProbe, BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i> in obema PCR-testoma	54
Preglednica 13: Primerjava pozitivnih rezultatov vseh petih metod	56
Preglednica 14: Primerjava pozitivnih rezultatov kombinacije metod.....	57
Preglednica 15: Statistično vrednotenje rezultatov kombinacije vseh metod	59
Preglednica 16: Število in delež izločenih vzorcev za potrebe statistične analize	60
Preglednica 17: Občutljivost posamezne metode glede na skupino bolnikov.....	61
Preglednica 18: Specifičnost posamezne metode glede na skupino bolnikov.....	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava pozitivnih rezultatov vseh petih metod glede na skupino bolnikov	55
Slika 2: Primerjava pozitivnih rezultatov kombinacije metod	58
Slika 3: Primerjava pozitivnih rezultatov različnih metod in kombinacije metod. Rdeče obrobjeni stolpci so rezultati, ki jih lahko dobimo v nekaj urah	58
Slika 4: Statistično vrednotenje rezultatov kombinacije vseh petih metod	59
Slika 5: Občutljivost posamezne metode glede na rezultate vzorcev vseh bolnikov skupaj..	61
Slika 6: Občutljivost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov s pljučnico ...	62
Slika 7: Občutljivost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov z apKOPB ...	62
Slika 8: Občutljivost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni	63
Slika 9: Specifičnost posamezne metode glede na rezultate vzorcev vseh bolnikov skupaj..	64
Slika 10: Specifičnost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov s pljučnico .	64
Slika 11: Specifičnost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov z apKOPB .	65
Slika 12: Specifičnost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni	65
Slika 13: Diagnostični algoritem za dokazovanje pnevmokoknih okužb dihal.....	80

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam vzorcev bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Priloga B: Seznam vzorcev bolnikov z apKOPB in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Priloga C: Seznam vzorcev bolnikov z drugimi boleznimi in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Priloga D: Model verjetja, uporabljen v statistični obdelavi

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

apKOPB	akutno poslabšanje kronične obstruktivne pljučne bolezni
bp	bazni par
CAP	zunajbolnišnična pljučnica (angl. community acquired pneumonia)
CI	interval zaupanja (angl. confidence interval)
CRP	C-reaktivni protein (angl. C-reactive protein)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimska imunoadsorpcijska preiskava (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
IL	interlevkin
KOPB	kronična obstruktivna pljučna bolezen
MALDI-TOF MS	angl. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
MSSA	za meticilin občutljivi <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>)
NNV	negativna napovedna vrednost testa
PAF	faktor aktivacije trombocitov (angl. platelet activating factor)
pbp	penicilin vežočni protein (angl. penicillin binding protein)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate-buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PCT	prokalcitonin
PNV	pozitivna napovedna vrednost testa
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. real-time polymerase chain reaction)
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor

1 UVOD

Okužbe spodnjih dihal so še vedno vodilni vzrok obolevnosti in pomemben vzrok smrtnosti po celem svetu. Približno ena tretjina bolnikov potrebuje bolnišnično oskrbo. Zaradi pljučnice umre od 7 do 14 % hospitaliziranih bolnikov (Mustafa in sod., 2011). Odkrivanje in identifikacija povzročiteljev okužb sta prednostni nalogi javnega zdravstva. Okužbe spodnjih dihal povzroča veliko različnih patogenov, toda le nekaj je takih, ki povzročijo večino primerov. Najpogostejši povzročitelj je *Streptococcus pneumoniae*, saj je vzrok za kar dve tretjini bakterijskih pljučnic tako pri odraslih kot tudi otrocih (Murdoch in sod., 2003; Mustafa in sod., 2011).

S. pneumoniae je za človeka ena izmed bolj patogenih bakterij, saj poleg pljučnice povzroča tudi bronhitis, meningitis in okužbe krvi (El Aila in sod., 2010). Postavitev diagnoze pnevmokokne pljučnice z uporabo klasičnih mikrobioloških tehnik je zahtevna, saj metoda izolacije bakterije iz krvi ni dovolj občutljiva, kultivacija iz izmečka lahko predstavlja kolonizacijo, invazivne metode odvzema vzorca pa se izvajajo le redko (Murdoch in sod., 2003). V laboratoriju bakterijo večinoma dokazujemo z direktno kultivacijo kliničnih vzorcev bolnikov in jo poskušamo razlikovati od ostalih, manj patogenih zelenečih streptokokov, ki so praviloma prisotni v respiratornih vzorcih. Izjemno težko morfološko ločevanje bakterije *S. pneumoniae* od drugih zelenečih streptokokov je verjeten vzrok nizke občutljivosti klasičnih mikrobioloških tehnik za dokazovanje bakterije *S. pneumoniae* (Mustafa in sod., 2011). Neposredno fenotipsko identifikacijo pnevmokokov opravljamo s testom občutljivosti za optohin, ki jo občasno ovirajo sevi bakterije *S. pneumoniae*, odporni proti optohinu, in zelo sorodna bakterija *Streptococcus pseudopneumoniae*, ki je lažno pozitivna tudi s komercialnim hibridizacijskim testom AccuProbe (El Aila in sod., 2010). Natančno razlikovanje je pomembno predvsem zaradi ustreznega antibiotičnega zdravljenja.

Kolonizacija zdravih posameznikov z bakterijo *S. pneumoniae* predstavlja težavo pri vrednotenju visoko občutljivih metod za zaznavanje okužbe s pnevmokoki. Bakterija kolonizira zgornja dihalna od 5 do 70 % zdravih odraslih in od 9 do 43 % zdravih otrok (Saravolatz in sod., 2007; Kadioglu in sod., 2002). Podatki se zelo razlikujejo glede na starost in življenjsko okolje posameznikov in tudi glede na metodo, ki so jo uporabili v posamezni raziskavi (Saravolatz in sod., 2007; Kadioglu in sod., 2002). Podatki o pogostosti kolonizacije z bakterijo *S. pneumoniae* pri bolnikih s kronično pljučno boleznijo v stabilni fazi so zelo redki (Patel in sod., 2002).

Večina pnevmokokov je dobro občutljiva za penicilin. Tisti, ki niso občutljivi, so večinoma zmerno odporni proti penicilinu, redki pa so visoko odporni (Catterall, 1999). Občutljivi in specifični testi, ki jih v kliničnem laboratoriju lahko hitro izvedemo, so nujni za zgodnjo diagnozo in učinkovito antibiotično zdravljenje. Zaznavanje s klasičnimi

tehnikami, kot sta kultura in serološke metode, je časovno potratno in rezultati so pogosto nejasni (McAvin in sod., 2001). Povzročitelj lahko ostane neodkrit kar v polovici primerov (Mustafa in sod., 2011). Alternativni pristopi za izboljšanje diagnostike pnevmokoknih okužb so različno uspešni. Merjenje pnevmokoknih protiteles se ni izkazalo kot zanesljivo za diagnostiko pljučnice (Murdoch in sod., 2003). Hitri imunokromatografski testi za zaznavanje topnih pnevmokoknih antigenov v urinu dajejo boljše rezultate (Murdoch in sod., 2003). Najobetavnejši so molekularni testi, ker imajo večjo občutljivost in specifičnost kot klasične mikrobiološke metode, ne moti jih prisotnost kontaminantov v kužninah in zaznajo tudi odmrle mikrobe, ki jih z metodo kulture ni možno potrditi (McAvin in sod., 2001).

1.1 NAMEN

Zgodnje empirično antibiotično zdravljenje okužb spodnjih dihal ponavadi temelji na znanju o verjetnem patogenu. Velika težava postaja pojav proti antibiotikom odpornih bakterij. Učinkovita ukrepa za preprečitev nastanka novih odpornih sevov sta uporaba ustreznih ozkospektralnih antibiotikov v ustreznih odmerkih in najkrajši možni čas zdravljenja. Zato je nujna hitra in natančna identifikacija povzročitelja okužbe (Mustafa in sod., 2011).

Najdba patogenega mikroorganizma v kužnini ne pomeni nujno, da je ta mikroorganizem res povzročitelj bolezni. Mikroorganizmi lahko le kolonizirajo dihalne poti. Zato je namen naše raziskave ugotoviti, kako pogosto so pnevmokoki lahko kolonizatorji, katera stanja olajšajo kolonizacijo in s katerimi mikrobiološkimi metodami lahko razlikujemo med okužbo in kolonizacijo.

Vsaka izmed metod, ki jih bomo uporabili, ima svoje slabosti in prednosti. Pričakujemo, da bomo s primerno kombinacijo različnih metod lahko dosegli želeno občutljivost in specifičnost mikrobiološke diagnostike pnevmokoknih okužb. Pričakujemo, da bomo z novimi diagnostičnimi metodami bistveno izboljšali odkrivanje bakterije *S. pneumoniae* pri bolnikih s sumom na zunajbolnišnično pljučnico. Pričakujemo tudi, da bodo razlike v deležu koloniziranih posameznikov med skupino bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB) v stabilni fazi in skupino bolnikov, ki bodo hospitalizirani zaradi neinfektivnih vzrokov.

V trenutno dostopni literaturi ni soglasja glede optimalne diagnostike pnevmokoknih okužb spodnjih dihal. S tako diagnostiko, ki izrablja prednosti več različnih mikrobioloških metod in s katero lahko razlikujemo kolonizacijo od okužbe z bakterijo *S. pneumoniae*, bomo ustvarili diagnostični algoritem za dokazovanje pnevmokoknih okužb dihal, s čimer bomo omogočili večjo uporabo penicilina za zdravljenje okužb spodnjih dihal. S tem bi znižali stroške zdravljenja in ekološko breme, saj bi zaradi manjšega selektivnega pritiska

upočasnili ali preprečili pojav bakterij, odpornih proti antibiotikom. Dobili bomo tudi epidemiološke podatke o razširjenosti kolonizacije z bakterijo *S. pneumoniae* pri različnih populacijah.

1.2 HIPOTEZE

Pri svojem delu bomo poskušali potrditi naslednje hipoteze:

- Delež zdrave odrasle populacije je koloniziran z bakterijo *S. pneumoniae*.
- Delež bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo, ki so kolonizirani z bakterijo *S. pneumoniae*, je višji kot pri zdravih ljudeh.
- Z ustrezno izbranimi začetnimi oligonukleotidi je možna dovolj občutljiva in specifična diagnostika pnevmokoknih okužb spodnjih dihal.
- Z ustrezno kombinacijo testov lahko povečamo število pravilno dokazanih pnevmokoknih okužb dihal in omogočimo ciljno antibiotično zdravljenje s penicilinom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EVOLUCIJA *S. pneumoniae*

Evolucija pnevmokokov temelji na rekombinaciji, kar povzema Donkor (2013) v svojem preglednem članku. Stopnja rekombinacije je desetkrat višja kot stopnja mutacije. Za primerjavo je pri bakteriji *Neisseria meningitidis* stopnja mutacij petkrat višja od stopnje rekombinacij. Vzrok visoke stopnje rekombinacij je lahko visoka gostota ponavljajočih se elementov v genomu, ki olajšajo sprejemanje tuje DNK v genom *Streptococcus pneumoniae* in prispevajo k preureditvi njegove strukture. Pogosti so ponavljajoči se elementi BOX, RUPS in SPITE, ki prispevajo k evoluciji pnevmokoknega genoma in so pomembni pri zaustavitvi transkripcije. Medvrstna rekombinacija pnevmokokov navadno poteka z izmenjevanjem dednega materiala streptokokov skupine mitis. Ta skupina streptokokov poleg pnevmokoka vsebuje še deset članov: *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus oligofermentas*, *Streptococcus parasanguinis* in *Streptococcus peroris*. *S. pneumoniae*, ki je glavni patogen v skupini, je tesno soroden s streptokokom *S. oralis*. Predvidevajo, da sta se obe vrsti razvili iz skupnega prednika. Izmenjavo dednega materiala med pnevmokoki in streptokoki skupine mitis poenostavi skupni življenjski prostor v nosnem delu žrela. Z analizo zaporedij gena *pbp* (angl. penicillin binding protein) so ugotovili, da so pnevmokoki med evolucijo mozaičnih genov *pbp* pridobili genomsko DNK od bakterij *S. oralis* in *S. mitis*. Mozaične pnevmokokne gene zaradi homologne rekombinacije s streptokokno skupino mitis so opazili tudi med geni za virulenčne dejavnike, npr. *lytA*, *nanA*, *pspA* in *pspC*. Med preučevanjem rekombinacije med streptokoki so odkrili tudi populacijo *S. pneumoniae*, za katero je značilna hiperrekombinacija. Taka pnevmokokna populacija, ki je glavni prejemnik genetskega materiala drugih streptokokov iz skupine mitis, je kazala veliko višjo stopnjo odpornosti proti različnim antibiotikom (penicilin, eritromicin, tetraciklin, kloramfenikol in cefotaksim) v primerjavi s pnevmokoki, ki niso kazali znakov take rekombinacije. Osnova za hiperrekombinacijo ni dobro raziskana, toda možno je, da gre za populacijo pnevmokokov, ki imajo v genomu nenavadno visoko gostoto ponavljajočih se zaporedij. K taki hiperrekombinaciji lahko prispevajo tudi okvare popravljalnih mehanizmov DNK. Čeprav obstajajo populacije pnevmokokov, za katere je značilna hiperrekombinacija, pa ni nobenih dokazov za populacijo streptokokov, za katere bi bila značilna hipermutacija genov (Donkor, 2013).

Pnevmokokni evolucijski dogodki se pogosto dogajajo na lokusu *cps*, ki nosi zapis za pnevmokokno kapsulo (Donkor, 2013). Pnevkokne gene *cps* obdajata dobro ohranjena gena *dexB* in *aliA*. Do homologne rekombinacije pride na teh dveh regijah, ki obdajata lokus *cps* in ki sta skupni vsem pnevmokoknim serotipom. Vsak pnevmokokni *cps* ima regijo, specifično za posamezen serotip, kjer rekombinacijski dogodki vodijo do menjave

tipa kapsule in posledično do tipa pnevmokokov, ki se lahko izognejo cepivu. Dodatno lahko rekombinacija na področju *cps* vodi do tipa kapsule, ki povzroči večjo pnevmokokno virulenco. Med določenimi geni z zapisom za kapsulo pride večkrat do rekombinacije kot med ostalimi. Možnih vzrokov za to je več, med njimi tudi različna organiziranost kapsularnega lokusa, zmožnost transformacije pnevmokoknega seva in hkratno sobivanje različnih pnevmokoknih sevov v nosnem delu žrela. Nedavno so ugotovili, da v lokusu *cps* pomembno vlogo pri menjavi tipa kapsule igrajo tudi mutacije (Donkor, 2013).

2.2 VIRULENČNI DEJAVNIKI

Določeni proteini ali encimi, ki so na površini po Gramu pozitivnih organizmov, bistveno prispevajo k patogenezi in so lahko vključeni v napredovanje bolezni, ki jo povzroča tak patogen (Jedrzejcas, 2001). Ti proteini so vpleteni v neposredne odnose med gostiteljevim tkivom in patogenom ali pa pomagajo skriti površino bakterije pred imunskim sistemom gostitelja. V preteklosti so menili, da je polisaharidna kapsula glavni pnevmokokni virulenčni dejavnik, saj so sevi brez kapsule skoraj popolnoma nenevarni v primerjavi s sevi s kapsulo. Druge raziskave so pokazale tudi vpliv drugih pnevmokoknih proteinov na razvoj bolezni in možnost njihove uporabe kot kandidatov za cepivo (McDaniel in sod., 1991). Taki proteini so: pnevmolizin, avtolizin, pnevmokokni površinski protein A, hialuronatna liaza, pnevmokokni površinski antigen A, holin vezavni protein A in nevraminidaza (Jedrzejcas, 2001).

V zadnjih letih je prišlo do izboljšane razumevanja povezovanja med pnevmokokom in gostiteljem; tako v smislu vpliva virulenčnih dejavnikov na patogenezo pljučnice kot tudi vpliva odziva gostitelja, ki je lahko koristen ali škodljiv (Catterall, 1999). Vloga citokinov pri pnevmokokni pljučnici, natančno obnašanje nevtrofilcev med boleznijo in mehanizmi, s katerimi se pnevmokok pritrudi na gostitelja tako med kolonizacijo nosnega dela žrela kot tudi med invazivno boleznijo, so bili predmet novejših raziskav (Catterall, 1999).

2.2.1 Kapsula in celična stena

Polisaharidna kapsula je najpomembnejši pnevmokokni virulenčni dejavnik, saj ščiti bakterije pred fagocitozo (Bogaert in sod., 2004). Kljub temu, da obstajajo sevi bakterije *S. pneumoniae* s kapsulo in brez kapsule, so iz kliničnih vzorcev izolirali le seve s kapsulo. Stopnja virulence kapsule je bolj odvisna od kemičnih lastnosti kapsule kot od velikosti (Catterall, 1999). Pomembnost kapsule so raziskovalci dokazali z encimatsko odstranitvijo kapsule ali z genetsko modificiranimi sevi, ki se razlikujejo le po tipih kapsule. Virulenca mutant se je razlikovala glede na tip kapsule (Kelly in sod, 1994).

Kapsula sama po sebi ni nevarna, saj je vzrok za virulenco le v njenih antifagocitčnih lastnostih. Sestavljena je iz enega od 90 serološko različnih polisaharidov. Izmed 90

različnih kapsularnih serotipov so z invazivno boleznijo najpogosteje povezani serotipi 1, 4, 5, 7, 9A in 14, medtem ko so serotipi 9N, 16F, 20 in 38 povezani z nizkim deležem prehoda v invazivno bolezen (Donkor, 2013; Pareson in sod., 2010). Raziskovalci menijo, da sta kemijska sestava in neto naboj vsakega kapsularnega serotipa odgovorna za te razlike v virulenci (Pareson in sod., 2010). Zaradi precejšnjih genetskih razlik med posameznimi sevi je težko ugotoviti pomembnost posameznega tipa kapsule v primerjavi z drugimi virulenčnimi dejavniki (Pareson in sod., 2010). Porazdelitev serotipov med izolati, ki kolonizirajo nosni del žrela, se rahlo razlikuje med posameznimi državami in starostno skupino (Bogaert in sod., 2004). Evropa in ZDA imata podobno porazdelitev serotipov. V zahodnih državah so pri otrocih, mlajših od treh let, najpogostejši serotipi 19F, 6B, 6A, 9V, 23F in 14 (Bogaert in sod., 2004). V Sloveniji v letu 2013 so bili najpogostejši serotipi 3 (17,0 %), 1 (11,6 %), 14 (8,7 %), 9V (8,3 %), 4 (7,9 %), 6A (6,1 %), 7F (5,8 %), 23F (5,1 %), 19A (4,0 %) in 6B (3,6 %). Teh deset serotipov skupaj predstavlja 78 % testiranih izolatov, ostali serotipi so bili zastopani v manj kot 3 % (Kraigher in sod., 2014).

Od več mehanizmov, ki jih imajo pnevmokoki, da se izognejo delovanju komplementa, najpomembnejšega predstavlja kapsula, ki prispeva k patogenezi bolezni s ščitenjem pnevmokokov pred opsonizacijo, ki jo povzroča komplement. Ščiti tudi pred ujetjem bakterij v sluzi (Pareson in sod., 2010). Kapsula preprečuje opsonizacijo in fagocitozo z več mehanizmi. Zmanjša verjetnost aktivacije komplementa po klasični poti z onemogočanjem C-reaktivnega proteina in preprečevanjem vezave protiteles IgG na bakterijsko površino. Kapsula tudi zmanjša alternativno pot aktivacije komplementa in zmanjša razgradnjo C3b do iC3b na bakterijski površini. Ti kombinirani učinki pnevmokokne kapsule ovirajo fagocitozo s receptorji Fc γ , receptorji komplementa in neopsonizacijskimi receptorji (Pareson in sod., 2010).

Izdelava specifičnih zaščitnih protiteles proti polisaharidom kapsule je osnova trenutnega antipnevmokoknega cepiva. Vpliv geografskih in časovnih razlik ter razlik v starosti nosilcev na razporejenost 90 serotipov in zmožnost *S. pneumoniae*, da prenaša kapsularne gene med sevi in spreminja specifičnost kapsule, imata močan vpliv na razvoj cepiva. Trenutno 23-valentno cepivo vsebuje serotipe, ki povzročijo 88 % okužb z bakteriemijo v ZDA in 96 % v VB (Catterall, 1999).

Nasprotno od kapsule pa celična stena povzroča vnetje, verjetno z aktivacijo komplementa in z vzbuditvijo citokinov. Aktivna komponenta celične stene je polisaharid, ki vsebuje fosforilholin, kar je precej redko med bakterijami. Fosforilholin omogoča mesto za pritrditev na aktivirane endotelijske celice med potekom invazivne bolezni. Protitelesa proti celični steni so zaščitna, toda zaščita je bistveno šibkejša kot pri protitelesih proti kapsularnemu polisaharidu (Catterall, 1999).

2.2.2 Pnevmozolin

Poleg površinskih polisaharidov pnevmokok vsebuje številne proteine, ki dokazano prispevajo k virulenci. Pnevmozolin je znotrajcelični toksin, ki se sprošča samo takrat, ko celična stena lizira. Avtolizin je encim, odgovoren za lizo celične stene. Pnevmozokni površinski protein A (PspA) je protein na površini celice in je močno imunogen pri miših. Ostali proteini, ki lahko prispevajo k patogenosti organizma, a njihova vloga v virulenci še ni popolnoma pojasnjena, so nevraminidaza, hialuronidaza, inhibitor nevtrofilne elastaze, različne proteaze, med njimi tudi taka proteaza, ki razgrajuje človeške IgA, inhibitor razpada nevtrofilcev in različni domnevni proteinski adhezini (Catterall, 1999).

Najbolj preučevan proteinski virulenčni faktor je pnevmozolin (Ply), to je toksin, ki lizira celične membrane s holesterolom in aktivira komplement. Njegova molekulska masa je 53 kDa in ga vsebujejo vsi klinični izolati bakterije *S. pneumoniae* (Jedrzejcas, 2001). Za razliko od ostalih pnevmokoknih antigenov pnevmozolin ni na površini celice. Je citoplazemski encim in se sprošča zaradi delovanja površinskega avtolizina.

Virulenčne lastnosti Ply so neposredno odvisne od delovanja avtolizina (Jedrzejcas, 2001). Pnevmozolin ima več škodljivih učinkov za gostiteljeve celice, zlasti v zgodnji patogenezi pnevmokokne okužbe (Catterall, 1999; Jedrzejcas, 2001). Encim deluje citotoksično na bronhialni migetalčni epitelij, upočasnjuje gibanje migetalk in prekine tesne stike v enoplastnem bronhialnem epiteliju (Jedrzejcas, 2001). Zaradi delovanja Ply se zmanjša zmogljivost migetalčnih celic, da čistijo sluz, kar še pospeši širjenje pnevmokokov. Delovanje Ply na alveolarne in pljučne epiteljske celice verjetno povzroča alveolarni edem in krvavitve med pnevmokokno pljučnico. Povzroči tudi motnje na alveolokapilarni membrani. Posledica je poplavljanje alveolov, kar omogoči hranila za bakterijsko rast in olajša prodor bakterij skozi epitelij v pljučni intersticij in kasneje v kri. Citotoksični učinki Ply neposredno inhibirajo fagocite in delovanje imunskih celic, kar se kaže kot dušenje gostiteljevega vnetnega in imunskega odziva. Nizke koncentracije Ply lahko inhibirajo oksidativne izbruhe nevtrofilcev in monocitov, njihovo kemotakso in baktericidno aktivnost ter izdelavo limfokinov in imunoglobulinov (Jedrzejcas, 2001). Pnevmozolin tudi aktivira komplement po klasični poti v odsotnosti protiteles, specifičnih proti temu toksinu (Pareson in sod., 2010). Delecija gena *ply* se kaže v povečani opsonizaciji in fagocitozi pnevmokokov po klasični poti aktivacije komplementa (Pareson in sod., 2010).

Raziskovalci so z različnimi študijami dokazovali virulenco Ply. Ko so ta proteinski virulenčni faktor vbrizgali v zgornji bronhij podgan, je povzročil resno pljučnico (Feldman in sod., 1999). Catterall (1999) v svojem preglednem članku navaja, da so vlogo v patogenosti dokazali tudi z laboratorijsko pripravljenimi sevi pnevmokokov, ki jim je manjkalo pnevmozolin; ti sevi so imeli manjšo virulenco v primerjavi z divjimi sevi. Tudi imunizacija miši s pnevmozolinom je ščitila miši pred virulentnimi pnevmokoki (Catterall,

1999). Dokazali so tudi, da citolitične lastnosti in aktivacijo komplemента povzročata različni regiji na molekuli pnevmolizina. Uporabili so seve pnevmokokov z mutacijami na teh dveh regijah in ugotovili, da vsaka regija prispeva k zgodnji patogenezi pnevmokokne pljučnice med različnimi fazami okužbe z različnimi mehanizmi. S podobnimi raziskavami z antiserumom in genetsko modificiranimi sevi so pokazali podoben prispevek avtolizina in PspA k patogenosti (Catterall, 1999).

2.2.3 Avtolizin

Avtolizini so člani močno razširjene skupine encimov, ki razgrajujejo peptidoglikan bakterij. So del celične ovojnice in igrajo tudi vlogo v različnih fizioloških celičnih procesih, povezanih z rastjo celične stene in delitvijo bakterijskih celic (Jedrzejcas, 2001).

Primer takega encima je pnevmokokna N-acetilmuramil-L-alaninska amidaza, imenovana tudi LytA-amidaza. Je najbolj preučevani avtolizin v tej skupini encimov in je vpleten v patogenost pnevmokokov (Jedrzejcas, 2001).

Pnevmokokna LytA-amidaza ima molekulska masa 36 kDa in je sestavljena iz dveh različnih domen. Prva domena je sestavljena iz 20 do 21 aminokislinskih ponavljajočih se zaporedij na C-terminalnem koncu in je odgovorna za pritrdjevanje na teihoično ali lipoteihoično kislino na površini pnevmokokov. Druga domena na N-terminalnem koncu je verjetno odgovorna za litično aktivnost encima (Jedrzejcas, 2001).

Glavna naloga te skupine encimov je razgradnja celične stene, ki vodi direktno v celično smrt (Jedrzejcas, 2001). Neposredna posledica razgradnje celične stene je vnetje, saj ti delci celične stene delujejo vnetno. Posredna posledica razgradnje celične stene je sprostitvev drugih virulencnih dejavnikov, na primer pnevmolizina (Jedrzejcas, 2001). Raziskovalci so ugotovili, da mutacije gena *lytA* v kromosomu bakterije *S. pneumoniae* vodijo v bistveno zmanjšano virulenco organizma v primerjavi z divjimi sevi (Jedrzejcas, 2001). Ugotovili so tudi, da pri miših pride do zaščitnega odziva, kadar LytA zasejejo v mišja pljuča. To kaže na morebitno vlogo LytA v prihodnjih cepivih proti bakteriji *S. pneumoniae* (Jedrzejcas, 2001). Predvidevajo, da protitelesa proti LytA preprečijo sprostitvev pnevmolizina (Jedrzejcas, 2001).

2.2.4 Pnevkokni površinski protein A

Pnevkokni površinski protein A (PspA) je zaščitni antigen za pnevmokoke in ščiti bakterijo pred delovanjem komplemента gostitelja (Jedrzejcas, 2001). Biološki dokazi kažejo, da PspA zmanjša fagocitozo in od komplemента odvisno odstranjevanje bakterije *S. pneumoniae*. Raziskovalci zaenkrat še niso odkrili pnevmokoknega seva brez tega proteina (Jedrzejcas, 2001). Pnevkokni površinski protein A se nahaja na površini

celične stene pnevmokokov. Protein ima več različnih regij. S prolinom bogata regija deluje kot vrstica in omogoča boljšo prožnost in gibanje N-terminalnega funkcionalnega dela proteina. N-terminalni del se razteza iz celične stene in verjetno seže celo izven kapsule. S preučevanjem strukture so ugotovili, da ima N-terminalni del PspA močno polaren elektrostatičen naboj, kar se kaže v stabilizaciji naboja kapsule prek elektropozitivnega dela in preprečevanju aktivacije komplemента z dominantnim elektronegativnim delom molekule. Vsa zaščitna monoklonska protitelesa, ki reagirajo s PspA, se vežejo na N-terminalni del molekule, zato je najverjetneje ta del molekule izpostavljen na površini. Ta domena kaže tudi večjo variabilnost zaradi akumuliranih mutacij, kar še dodatno potrjuje, da je ta del molekule izpostavljen na površini (Jedrzej, 2001).

C-terminalni del molekule, ki se imenuje tudi holin-vezavna regija, sidra molekulo PspA na površino bakterije. Pnevkokoki imajo na površini nenavadno molekulo fosfoholin, ki je na celični steni del teihoične kisline in v membrani del lipoteihoične kisline. PspA je na pnevmokokih pritrjen z nekovalentno vezavo na holin teihoične kisline in lipoteihoične kisline. Poznamo še druge holin-vezavne proteine, med njimi tudi LytA in CbpA (Jedrzej, 2001).

2.2.5 Hialuronatna liaza

Hialuronatna liaza (Hyl) je še en pomemben površinski protein bakterije *S. pneumoniae* z antigensko variabilnimi lastnostmi, ki so verjetno nujne za pnevmokokno virulenco (Jedrzej, 2001). Predstavlja tudi alternativo za pnevmokokno cepivo, še zlasti v kombinaciji z drugimi pnevmokoknimi virulenčnimi dejavniki, na primer PspA in pnevmolizinom. Hyl ima molekulsko maso 107 kDa in je sestavljen iz dveh domen. C-terminalni del vsebuje hidrofobni rep in skupino nabitih aminokislinskih ostankov, s katerimi se kovalentno poveže s peptidoglikanom celične stene. Katalitično aktivnost ima drugi del proteina, ki se veže na substrat in ga razgrajuje. Encim začne razgrajevati verigo hialurona na reducirajočem koncu in se med postopkom počasi premika proti nereducirajočemu koncu, dokler ni razgrajena celotna veriga hialurona. Hyl razgradi hialuron do disaharidov, ki so tako najmanjši produkti razgradnje (Jedrzej, 2001).

Hialuronatna liaza je del širše skupine encimov hialuronidaz. Ti encimi olajšajo prodor bakterij v tkiva, saj razgrajujejo zunajcelični matriks (Jedrzej, 2001). Povečana prepustnost tkiva, ki je posledica delovanja hialuronidaz, igra pomembno vlogo pri okužbah ran, pljučnicah in sepsah. Poznamo tri vrste hialuronidaz, ki razgrajujejo hialuron na tri različne načine. Glavni substrat hialuronskih liaz je hialuronan, ki je zelo razširjen in pomembna komponenta zunajceličnega matriksa vretenčarjev. Hialuronan je sestavljen iz ponavljajočih se enot D-glukuronske kisline in N-acetil-D-glukozamina (Jedrzej, 2001). V majhnih količinah je prisoten v vseh tkivih in tekočinah višjih organizmov. Poleg

strukturne vloge so ugotovili, da ima hialuronan tudi vlogo v obrambnih mehanizmih. Koncentracijo hialurona na epitelnih celicah, pljučnih fibroblastih in ostalih celičnih površinah uravnavajo različni citokini z nadzorom biosinteze in razpadom hialurona. Pnevmonokna hialuronatna liaza je z razgrajevanjem hialuronana neposredno vpletena v razširjanje bakterije *S. pneumoniae* v tkivih gostitelja. Bakterije sproščajo encim v tkivo, ki jih obdaja, in si s tem olajšajo vdor (Jedrzejcas, 2001).

2.2.6 Pnevmonokni površinski antigen A

Pnevmonokni površinski antigen A (PsaA) je tudi virulenčni dejavnik pnevmokokov. Protein ima molekulska masa 34,5 kDa in je sestavljen iz 309 aminokislinskih ostankov. Vsajen je na celično membrano bakterije *S. pneumoniae* prek lipidne komponente, ki je kovalentno pritrjena na protein. PsaA je prisoten pod plastjo peptidoglikana in kapsulo pnevmokokov, zato na površini celice ni prisoten (Jedrzejcas, 2001).

Najverjetnejša vloga PsaA je transport ionov Mn^{2+} in Zn^{2+} v citoplazmo bakterije (Jedrzejcas, 2001). PsaA ima mesto za vezavo kovinskih ionov Zn^{2+} , toda zaradi manjše specifičnosti se na mesto lahko vežejo tudi ioni Mn^{2+} . S prisotnostjo kovinskih ionov verjetno pomaga kateri drugi molekuli za pritrjanje (npr. CbpA), ki deluje odvisno od prisotnosti Mn^{2+} ali Zn^{2+} (Jedrzejcas, 2001). PsaA v miših izzove zaščitni odgovor. Toda ugotovili so tudi, da so PsaA-negativne mutante v miših ravno tako virulentne (Berry in Paton, 1996).

2.2.7 Holin vezavni protein A

Holin-vezavni protein A (angl. choline binding protein A – CbpA) so prepoznali kot glavni CBP (angl. choline binding protein) (Jedrzejcas, 2001). Je površinski protein in ima zmožnost reagiranja s človeškimi zaščitnimi protitelesi. Sestavljen je iz 663 aminokislinskih ostankov in ima molekulska masa 75 kDa. CbpA kot tudi ostali proteini CBP (npr. PspA in LytA) so sestavljeni iz več delov. Imajo C-terminalni del, ki se veže na holin, sledi povezovalni peptid, bogat s prolinom, in N-terminalni del. Del za vezavo holina je sestavljen iz več ponavljajočih se regij in se veže na holinske ostanke teihoične ali lipoteihoične kisline, prisotne na površini bakterije *S. pneumoniae* (Jedrzejcas, 2001).

Glavna naloga CbpA je pritrjanje na tkiva gostitelja. To vlogo so potrdili z negativnimi mutantami CbpA (Jedrzejcas, 2001). Molekula deluje kot vezni element med holinom teihoične ali lipoteihoične kisline in glikokonjugati človeških celic. N-terminalni del se veže na celice, C-terminalni del na holin. Do te povezave pride samo pri celicah, ki so jih aktivirali citokini. Domnevajo, da je proces vpleten v napredovanje pnevmokokne bolezni od kolonizacije do invazije (Jedrzejcas, 2001). Drugi raziskovalci predlagajo, da CbpA le blokira holinske ostanke na celični steni in s tem prepreči povezovanje z gostiteljskimi

celicami. V temu primeru bi CbpA preprečil vezavo receptorja PAF na aktiviranih človeških celicah s fosfoholinom na pnevmokokni celični steni (Cundell in sod., 1995). Obe možnosti, pnevmokokno pritrjevanje ali pnevmokokno blokiranje holina, sta enako verjetni (Jedrzejcas, 2001).

2.2.8 Nevraminidaza

Nevraminidaza je pnevmokokni virulenčni faktor, prisoten na vseh preiskovanih sevih (Jedrzejcas, 2001). Obstajata dve obliki pnevmokoknih nevraminidaz, NanA in NanB. NanA ima molekularno maso 108 kDa, NanB pa 75 kDa. NanA je prisotna na površini pnevmokoknih celic. Aktivnost NanB je približno stokrat nižja od aktivnosti NanA. Ni popolnoma pojasnjeno, zakaj organizem proizvaja dve različni nevraminidazi. Verjetno je vsak tip encima specializiran za določeno okolje, kar je pomembno med kolonizacijo ali invazijo organizma. To potrjuje tudi različna aktivnost encimov pri različnih vrednostih pH. NanA ima maksimalno aktivnost pri približno pH 5, NanB pa pri približno pH 7 (Jedrzejcas, 2001).

Nevraminidaza reže terminalno sialično kislino celičnih površinskih glikanov (mucin, glikolipidi, glikoproteini) in s tem povzroča poškodbe gostiteljevim celičnim glikanom kot tudi gostitelju na splošno. Ta postopek spremeni glikozilacijske vzorce gostitelja in verjetno izpostavi več površine gostiteljevih celic, kar razkrije več površinskih receptorjev za povezavo s pnevmokoki in tako prispeva k boljšemu pritrjevanju. S tem okrepi kolonizacijo z bakterijo *S. pneumoniae* zaradi delovanja na glikane (Jedrzejcas, 2001).

2.3 CEPIVO

Kljub uporabi antibiotikov obolevnost in smrtnost zaradi invazivne pnevmokokne okužbe ostajata visoki, delno verjetno zaradi širjenja antibiotične odpornosti pri pnevmokokih (Song in sod., 2013). Zato postaja cepljenje ključno za zaščito pred pnevmokoknimi okužbami. Čeprav je pnevmokokna okužba pogosta in so že kmalu začeli z razvojem cepiva, razvoj učinkovitega cepiva dolgo časa ni bil uspešen (Pletz in sod., 2008). Glavni razlog je nizka imunogenost polisaharidov, ki so tarča opsonizirajočih protiteles. Trenutno sta v klinični uporabi dva tipa cepiv: polisaharidna cepiva in pnevmokokna konjugirana cepiva (Pletz in sod., 2008).

Polisaharidna cepiva so na voljo od sredine osemdesetih let prejšnjega stoletja. Trenutno je na voljo Pneumovax23 (Merck, Darmstadt, Nemčija), ki vsebuje očiščene kapsularne polisaharide 23 pnevmokoknih serotipov (1, 2, 3, 4, 5, 6b, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F in 33F) (Pletz in sod., 2008; Moffitt in Malley, 2011). Polisaharidi primarno vzbudijo imunski odziv, odvisen od celic B, zaradi sproščanja imunoglobulinov M (IgM). Taka polisaharidna cepiva niso priporočljiva za otroke, mlajše

od dveh let, zaradi njihovega nedozorelega imunskega sistema (Pletz in sod., 2008). Cepljenje odraslih s polisaharidnimi cepivi zahteva ponovno cepljenje po petih do šestih letih. Zlasti med starejšimi bolniki je veliko takih, ki se na taka cepiva ne odzivajo. 23-valentno polisaharidno cepivo je namenjeno starejšim otrokom in odraslim, pri katerih obstaja tveganje za pnevmokokno okužbo. Cepivo ni odobreno za uporabo pri otrocih, mlajših od dveh let. V nekaterih državah je priporočljivo za vse odrasle nad 60. letom starosti (Pletz in sod., 2008).

Polisaharidna cepiva ne izzovejo sluznične imunosti, ne vplivajo na kolonizacijo asimptomatskih nosilcev in ne vplivajo na čredno imunost (Pletz in sod., 2008). Predhodno cepljenje ne prepreči novih okužb zgornjih in spodnjih dihal, vpliva pa na blažji potek bolezni. Zato je cepljenje s polisaharidnimi cepivi kljub vsemu priporočljivo. Velika prednost polisaharidnih cepiv je v velikem številu serotipov, vključenih v cepivo, saj naj bi bilo s tem cepivom pokritih kar 80 % pnevmokoknih okužb pri odraslih. To so dokazali tudi v raziskavi, kjer je cepljena populacija imela manjšo verjetnost bakteriemije (15 % namesto 35 %), manjšo smrtnost (1,6 % namesto 6,1 %), manj časa povišano telesno temperaturo (1,7 dni namesto 2,9 dni) in hitrejši odpust iz bolnišnice (po 9,4 namesto 11,3 dneh) (Pletz in sod., 2008).

Pnevmokoknih konjugiranih cepiv je na trgu več. Sedemvalentno pnevmokokno konjugirano cepivo (PCV-7) (Prevnar, Pfizer, New York, ZDA) vsebuje kapsularne polisaharide serotipov pnevmokokov, ki najpogosteje povzročajo okužbe pri otrocih (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F in 23F) (Pletz in sod., 2008; Moffitt in Malley, 2011). Sedem kapsularnih polisaharidov cepiva PCV-7 je konjugiranih na močno imunogen nosilni protein 197 (CRM₁₉₇, t.j. nestrupen navzkrižno reaktiven mutirani difteroidni toksin – toksoid) (Pletz in sod., 2008; Moffitt in Malley, 2011). To cepivo je še zlasti učinkovito pri majhnih otrocih (Pletz in sod., 2008). Podobno kot pri cepljenju s cepivom proti okužbam z bakterijo *H. influenzae* tipa B, se tudi CRM₁₉₇-specifične celice pomagalk T tipa 2 (Th2) povežejo s celicami B. Te prek specifičnih protiteles IgM vežejo kompleks pnevmokoknih polisaharidov in CRM₁₉₇. Na ta način antigen-predstavitvene celice B predstavljajo protein CRM₁₉₇ prek kompleksa MHC II efektorskim celicam T. Za ta tip adaptivnega imunskega odziva je značilno menjavanje protitelesnih izotipov in tvorjenje spominskih celic B. PCV-7 izzove imunski odziv na sluznici, verjetno zaradi spodbujanja tvorjenja protiteles IgA. Sluznična imunost omogoči asimptomatskim nosilcem, da se znebijo pnevmokokov tistih serotipov, ki so vključeni v cepivo in ki kolonizirajo sluznico. To cepivo je tudi uspešno pri preprečevanju napredovanja invazivne okužbe za serotipe pnevmokokov, vključenih v cepivo. Slabost konjugiranih cepiv je njihova nizka pokritost pnevmokoknih serotipov, saj pokrijejo le 50 % pnevmokoknih okužb v Nemčiji (Pletz in sod., 2008).

Cepivo PCV-7 so v ZDA odobrili leta 2000 in nato še v številnih drugih državah z različnimi programi cepljenja (Pletz in sod., 2008). Glede na podatke Svetovne

zdravstvene organizacije so klinično učinkovitost cepiva dokazali z dvema programoma cepljenja: cepljenje pri šestih tednih, desetih in štirinajstih tednih starosti ali cepljenje pri dveh mesecih, štirih in šestih mesecih starosti, čemur sledi poživitveni odmerek pri dvanajstih do petnajstih mesecih starosti (Pletz in sod., 2008).

V zadnjih letih so odobrili več pnevmokoknih cepiv z razširjeno valentnostjo (trinajstvalentno Prevnar, Pfizer, New York, ZDA; desetvalentno s tremi različnimi nosilnimi proteini Synflorix, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgija), petnajstvalentno PCV (Merck, Darmstadt, Nemčija) pa je še na stopnji preizkušanja (Moffitt in Malley, 2011).

Zatiranje pnevmokoknih serotipov, vključenih v cepiva, pri asimptomatskih nosilcih je ustvarilo ekološko nišo za serotipe, ki niso vključeni v cepiva (Pletz in sod., 2008). Podatki kažejo, da se je pri otrocih, mlajših od dveh let, močno zmanjšala pojavnost invazivne pnevmokokne okužbe. To je posledica skoraj popolnega izkoreninjenja serotipov, vključenih v cepiva, in serotipov, pri katerih je navzkrižna imunost posledica cepljenja. Nasprotno se je za 45 % povečalo število primerov okužb, povzročenih s serotipi, ki niso vključeni v cepiva (Pletz in sod., 2008). Genetske analize pnevmokoknih izolatov, zbranih po začetku programa pnevmokoknega cepljenja, kažejo, da je povečanje deleža serotipov, ki niso vključeni v cepiva, posledica širjenja že prej obstoječih sevov in ne pojav novih pnevmokoknih klonov. Izjema je serotip 19A, pri katerem je po predstavitvi cepiva PCV-7 prišlo do rekombinacije in sedaj kaže tudi lastnosti drugih serotipov (Pletz in sod., 2008). V prihodnosti lahko povečevanje prevalence serotipov, ki niso vključeni v cepiva, predstavlja grožnjo že doseženemu uspehu pnevmokoknih cepiv (Pletz in sod., 2008). Pride lahko do povečanega pojavljanja okužb kot tudi do povečane antibiotične odpornosti. V letu 1999 je večina proti penicilinu odpornih pnevmokokov spadala v serotipe 14, 9F, 23F, 19F in 6B. V letu 2005 pa je večina proti penicilinu odpornih pnevmokokov spadala v serotipa 35B in 19A. Za rešitev menjave serotipov v cepljeni populaciji in za izboljšanje konjugiranih cepiv raziskovalci preučujejo več možnosti. Ena možnost bi bila odkritje antigena, ki ni odvisen od serotipa. Za ta namen preučujejo pnevmokokne membranske proteine. Druga možnost za preprečevanje menjave serotipov je stalno spremljanje serotipov in sprotno spreminjanje sestave cepiva. Primer te rešitve je novo trinajstvalentno konjugirano cepivo. Zaradi tehničnih razlogov izdelava konjugiranega cepiva, ki bi vsebovalo vse serotipe, trenutno ni možna (Pletz in sod., 2008).

2.4 PROTEINI IN CEPIVA

Pnevmokokni proteini so od timusa odvisni antigeni in lahko bi jih uporabili za izboljšanje cepiva. Trenutno cepivo temelji na kapsularnih polisaharidih, ki so od timusa oz. celic T neodvisni antigeni in ki izzovejo odziv protiteles s spodbujanjem B-limfocitov neposredno, brez pomoči celic T. Taka cepiva imajo dve slabosti, zelo slab odziv pri otrocih, mlajših od

dveh let, in pomanjkanje obnovitvenega odziva pri ponovni izpostavitvi antigenu (Catterall, 1999). S konjugacijo polisaharidnih antigenov in proteinov bi jih lahko spremenili v obliko, ki je odvisna od timusa in ki nima teh dveh pomanjkljivosti. Sicer ni nujno, da je nosilni protein pnevmokokni, toda pnevmokokni proteini imajo prednost, da dajo vrstno specifično imunost (Catterall, 1999). Možna pomanjkljivost takih cepiv je v tem, da lahko vanje vključijo le omejeno število serotipov.

Klinično pomembna skupina pnevmokoknih proteinov so tudi transkarboksipeptidaze v celični steni, ki vežejo penicilin (penicillin binding proteins oz. PBP) (Catterall, 1999). Spremembe lastnosti proteinov za vezavo penicilina so posledica prenosa genov za PBP od drugih streptokoknih vrst. Pride do mozaičnih genov, ki lahko nastanejo, ne da bi okrnili lastnosti proteinov za gradnjo celične stene. Ker se prenašajo le deli genov in ker je mnogo različnih PBP, ki se lahko postopoma spremenijo, se stopnja odpornosti proti penicilinu lahko zelo razlikuje (Catterall, 1999). Postopna odpornost proti penicilinu ima neposreden vpliv na klinično prakso. Proti penicilinu odporni sevi *S. pneumoniae* večinoma kažejo le intermediarno odpornost (minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) 0,12–1 µg/mL) proti penicilinu (Catterall, 1999). Te zmerno odporne inhibitorne koncentracije v pljučih zlahka presežemo s parenteralno terapijo z visokimi odmerki penicilina (Catterall, 1999). Tako je penicilin za zdravljenje pnevmokokne pljučnice še vedno učinkovit kljub visoki odpornosti proti penicilinu pri pnevmokokih (Catterall, 1999). Raziskovalci priporočajo alternativo (cefalosporin tretje generacije) le takrat, kadar pljučnica ogroža življenje ali kadar je prisotna visoka stopnja odpornosti proti penicilinu (MIC > 2,0 µg/mL) (Catterall, 1999). Tega principa niso dokazali pri pnevmokokih, odpornih proti eritromicinu, zato priporočajo uporabo drugih antibiotikov in ne makrolidov (Catterall, 1999). Leta 1999 so poročali, da se odpornost proti penicilinu povečuje po celem svetu in da je težava še zlasti pogosta v Španiji, Vzhodni Evropi, Južni Afriki, Južni Ameriki in Koreji, kjer so o taki odpornosti poročali pri 30–50 % izolatov (Catterall, 1999). Tudi v drugih državah, kjer sicer nimajo veliko odpornih organizmov, so poročali o povečevanju deleža pnevmokokov, odpornih proti penicilinu kot tudi proti eritromicinu in drugim antibiotikom (Catterall, 1999). Večina odpornih sevov je pripadala majhnemu številu serotipov (6, 14, 19 in 23), ki so pogosti pri malih otrocih in ki so vključeni v nova konjugirana cepiva (Catterall, 1999). Od leta 2004 do 2012 so z veliko mednarodno raziskavo T.E.S.T. preučevali odpornost proti različnim antibiotikom pri izolatih bakterije *S. pneumoniae* (Tomic in Dowzicky, 2014). Ugotovili so, da so izolati bakterije *S. pneumoniae* po celem svetu še vedno zelo občutljivi za vankomicin (100 %), linezolid (> 99,9 %), tigeciklin (99,9 %) in levofloksacin (> 98,9 %). Občutljivost za penicilin se je pri izolatih bakterije *S. pneumoniae* med leti 2004–2008 in 2009–2012 statistično značilno povečala iz 60,0 % na 64,8 %. Visoko odpornost (R) proti penicilinu so ugotovili pri 14,8 % izolatov bakterije *S. pneumoniae*. 23,4 % izolatov je bilo zmerno odpornih (intermediarno – I) (Tomic in Dowzicky, 2014). Občutljivost za ceftriakson se je med leti 2004–2008 in 2009–2012 po celem svetu zmanjšala za 3,2 %; s 96,3 % na 93,1 %. Občutljivost za meropenem se je

povečala z 79,5 % na 83,4 %. Občutljivost za makrolide se je močno razlikovala glede na svetovno regijo. V azijsko-pacifiški regiji je bila le 45 %, toda v Južni Ameriki kar 72–73 %. V obdobju raziskave so največjo spremembo v občutljivosti opazili pri minociklinu. Občutljivost za ta antibiotik je padla z 72,1 % v letih 2004–2008 na 51,7 % v letih 2009–2012 (Tomic in Dowzicky, 2014). O podobnih občutljivostih pri izolatih bakterije *S. pneumoniae* poročajo iz Bosne (Karcic in sod., 2015). Ugotovili so, da je 45 % sevov odpornih proti eritromicinu, 45 % proti klindamicinu, 4,4 % proti penicilinu, 73,9 % proti oksacilinu in 5,3 % sevov odpornih proti trimetoprim/sulfametoksazolu (Karcic in sod., 2015). V Sloveniji je bilo v letu 2013 med testiranimi izolati bakterije *S. pneumoniae* 7,9 % zmerno odpornih (I) ali visoko odpornih (R) proti penicilinu po kriterijih za oralno zdravljenje in 1,1 % odpornih proti cefalosporinom tretje generacije (Kraigher in sod., 2014).

2.5 *S. pneumoniae* IN OKUŽBE PRI LJUDEH

Okužbe, ki jih povzročajo po Gramu pozitivne bakterije pri ljudeh, postajajo čez čas vedno zahtevnejše za zdravljenje, predvsem zaradi pojava sevov, odpornih proti antibiotikom (Jedrzejcas, 2001). Taka bakterija je tudi *S. pneumoniae*. Kot povzročitelja okužb so jo prepoznali kmalu po njenem odkritju leta 1881 (Catterall, 1999). Naseljuje zgornja dihala in povzroča vnetje srednjega ušesa, pljučnico, bakteriemijo in meningitis (Jedrzejcas, 2001).

Vnetje srednjega ušesa je najpogostejša pnevmokokna bolezen in najpogostejša bakterijska okužba pri otrocih (Donkor, 2013; Leibovitz in Greenberg, 2004). Akutno vnetje srednjega ušesa je pogosto pri otrocih v starosti od treh mesecev do treh let; najvišja incidenca je v starosti med šestimi in devetimi meseci (Leibovitz in Greenberg, 2004). Do enega leta starosti kar 60 % otrok preboli vsaj eno akutno vnetje ušesa. Približno 80 % otrok ima vsaj enkrat akutno vnetje ušesa in približno 80–90 % vsaj enkrat vnetje ušesa z izlivom pred vstopom v šolo (Harmes in sod., 2013). Poglavitni bakterijski povzročitelji so *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* in *Moraxella catarrhalis* (Leibovitz in Greenberg, 2004). *S. pneumoniae* povzroča 40 % okužb. V ZDA vsako leto prijavijo 7 milijonov primerov vnetij srednjega ušesa, povzročitelj katerih je *S. pneumoniae* (Jedrzejcas, 2001). Čeprav je antibiotična terapija potrebna le pri 20–30 % primerov akutnega vnetja ušesa zaradi pogoste spontane ozdravitve, večino bolnikov vseeno zdravijo z antibiotiki, saj tega majhnega števila bolnikov ni enostavno odkriti (Leibovitz in Greenberg, 2004).

S. pneumoniae je najpogostejši povzročitelj bakterijskih pljučnic, saj povzroči kar do 70 % vseh primerov pljučnic, zdravljenih v bolnišnicah (Catterall, 1999). Pnevmonokna pljučnica je precej pogosteje povezana z bakteriemijo kot katerakoli druga bakterijska pljučnica, saj se bakteriemija pojavi pri kar 20–30 % primerov pnevmokoknih pljučnic (Catterall, 1999; Donkor, 2013). Obstajajo tudi dokazi, da število primerov pnevmokokne pljučnice narašča (Catterall, 1999). Incidenca pnevmokokne pljučnice se v prejšnjem

stoletju ni bistveno spremenila, toda smrtnost se je bistveno zmanjšala zaradi uporabe antibiotikov (Örtqvist in sod., 2005). Pnevmonokna pljučnica je v tem času ostala resna bolezen večinoma pri starejših in tistih, ki že bolehalo za kako drugo boleznijo (Örtqvist in sod., 2005). Skupna letna incidenca pljučnice prebivalstva v razvitem svetu je okoli 1 % in pnevmokok je odgovoren za približno polovico teh primerov. Tako skoraj pet od tisoč oseb na leto dobi pnevmokokno pljučnico, s tem da je incidenca pri starejših in mladih bistveno višja (Örtqvist in sod., 2005). Samo v ZDA vsako leto prijavijo več kot pol milijona primerov pnevmokokne pljučnice, od tega jih je 5–7 % smrtnih (Jedrzejcas, 2001). V državah nerazvitega sveta vsako leto umre pet milijonov otrok, mlajših od pet let, zaradi akutne okužbe spodnjih dihal, kjer je *S. pneumoniae* verjetno glavni povzročitelj (Catterall, 1999; Jedrzejcas, 2001). Večina smrtnih okužb je pri ostarelih (Jedrzejcas, 2001). Tudi pri bolnikih z okužbo z virusom HIV je veliko tveganje za pnevmokokno pljučnico in bakteriemijo (Catterall, 1999).

S. pneumoniae je povzročitelj približno dveh tretjin bakterijskega meningitisa v Evropi in ZDA (Mook-Kanamori in sod., 2011). Kljub napredku v medicini smrtnost pnevmokoknega meningitisa ostaja 16–37 % in nevrološke posledice okužbe, to so izguba sluha, žariščne nevrološke in kognitivne motnje, ostanejo pri 30–52 % preživelih bolnikov (Mook-Kanamori in sod., 2011). Pnevmonokni meningitis ima najvišjo smrtnost od vseh pnevmokoknih okužb (Donkor, 2013). V ZDA je vsako leto prijavljenih tri tisoč primerov meningitisa, povzročitelj katerih je *S. pneumoniae* (Jedrzejcas, 2001).

Po svetu se med pnevmokoki povečuje odpornost proti penicilinu. Omejena uporaba cepiva proti pnevmokokom in antibiotična odpornost kažeta na to, da se lahko v prihodnjih letih obolevnost in smrtnost zaradi te bakterije še povečata (Catterall, 1999).

2.6 *S. pneumoniae* KOT DEL MIKROBIOTE ZGORNJIH DIHAL

S. pneumoniae je lahko del mikrobiote zgornjih dihal ljudi, ki ga večinoma nosijo v nosu in žrelu (Donkor, 2013; Cardozo in sod., 2004). Največji delež nosilcev je med otroki, njihovo število narašča od rojstva in ima vrhunec pri starosti od enega do dveh let, nato počasi upada (Donkor, 2013). Kolonizacija s pnevmokoki večinoma traja nekaj tednov, možna je tudi daljša od 30 tednov. Razlike so tudi med posameznimi letnimi časi, največ nosilcev je med januarjem in marcem. Otroci pridejo v stik z različnimi sevi pnevmokokov, manj imunogene seve prenašajo v nosnem delu žrela dalj časa kot bolj imunogene. Delež nosilcev je višji v nerazvitih deželah (60–80 % pri otrocih in okoli 20 % pri odraslih) kot v razvitih deželah (10–50 % pri otrocih in okoli 10 % pri odraslih) (Donkor, 2013).

Ljudje so glavni gostitelji bakterije *S. pneumoniae*, zato je prenos med ljudmi ključen za preživetje organizma. Do kapljičnega prenosa pnevmokokov pride pri ljudeh s

pnevmokokno okužbo ali pri zdravih ljudeh, ki prenašajo to bakterijo v nosnem delu žrela (Donkor, 2013). Enostavno se prenašajo med otroki v vrtcih, v isti družini pa navadno s kapljičnimi izločki starejšega otoka na mlajšega (Cardozo in sod., 2004). O dejavnikih tveganja za prenos pnevmokokov ni veliko znanega (Donkor, 2013). Znano je, da do večjega števila prenosov pride v centrih za dnevno nego, vojašnicah in zaporih. Ko gostitelj pridobi pnevmokoke, se pri večini vzpostavi asimptomatska kolonizacija v nosnem delu žrela. Asimptomatskih nosilcev pnevmokokov je veliko več kot simptomatskih bolnikov, zato prenos od osebe do osebe večinoma ni prepoznan (Donkor, 2013). Prehod iz kolonizacije do okužbe je zapleten postopek in je odvisen tako od pnevmokoknih virulencnih dejavnikov kot lastnosti gostitelja. Poleg vsega je pomembna tudi sestava mikrobiote v nosnem delu žrela, ki je sestavljena iz več kot 700 različnih vrst. Ta namreč lahko spodbuja ali ovira kolonizacijo oz. pnevmokokno okužbo s simbiozo ali tekmovanjem s pnevmokoki. Ali bo ostalo pri kolonizaciji ali bo sledila okužba, je tudi močno odvisno od serotipa pnevmokoknega seva (Donkor, 2013).

2.7 KOLONIZACIJA V NOSNEM DELU ŽRELA

Začetni korak pri patogenezi pnevmokokne okužbe je pritrđitev organizma na sluz in celice nosnega dela žrela (Catterall, 1999). Raziskovalci menijo, da pritrđevanje pnevmokokov na celice gostitelja poteka v dveh korakih (Jedrzejcas, 2001). Prvi korak vključuje iskanje anatomske niše v gostitelju, kot je na primer nosni del žrela, kjer se pnevmokoki vežejo na gostiteljeve površinske glikokonjugate respiratornih epitelnih in endoteltnih celic. Zatem sledi aktivacija citokinov, ki se kaže v izražanju novih glikanov na površini aktiviranih celic in močnejšem pritrđevanju pnevmokokov. Primer take citokinske aktivacije je ekspresija receptorja PAF (angl. platelet activating factor) na površini nekaterih gostiteljevih celic. Ta dva koraka vodita k vdoru pnevmokokov v gostitelja in k pnevmokokni okužbi (Jedrzejcas, 2001).

V pritrđevanje *S. pneumoniae* na gostitelja je vključenih veliko molekul za pritrđevanje (adhezinov), ki se izražajo na površini pnevmokokov. Primer takih molekul sta CbpA (angl. choline-binding protein A oz. holin-vezavni protein A) in nevraminidaza (Jedrzejcas, 2001). Poleg pritrđevanja na gostiteljske celice so pnevmokoki razvili še druge načine, da lahko vplivajo na gostitelja in njegova tkiva. Tako delovanje vključuje mnoge gostiteljeve celice, tkiva in dele tkiva in zato patogen uporablja veliko površinskih makromolekul (Jedrzejcas, 2001). Take molekule, ki niso neposredno povezane s pritrđevanjem pnevmokokov na gostiteljeve celice, so PspA/PspC (pnevmokokni površinski protein A/C), Hyl (hialuronatna liaza), Ply (pnevmolizin), LytA (avtolizin) in PsaA (pnevmokokni površinski antigen A) (Jedrzejcas, 2001). Ti proteini so vpleteni v delovanje komplementnega sistema gostitelja (PspA), razgradnjo hialuronana zunajceličnega matriksa, lizo membran s holesterolom (Ply) in razgradnjo peptidoglikanske plasti pnevmokokov, s čimer se lahko sprostijo citoplazemski Ply in vnetni ostanki razgrajene

celične stene (LytA) (Jedrzejcas, 2001). Dodatno površinski proteini prispevajo k hidrofobni in elektrostatski površini pnevmokokov ter verjetno pomagajo pri pritrjevanju na gostiteljske celice prek nespecifičnega fizikalno-kemičnega delovanja (Bogaert in sod., 2004). Vse lastnosti teh proteinov močno olajšajo pnevmokokno kolonizacijo in kasnejši vdor pnevmokokov. Izguba omenjenih lastnosti vodi v zmanjšano patogenost *S. pneumoniae* (Jedrzejcas, 2001). Zato ti proteini lahko služijo kot tarča pri razvoju novih načinov zdravljenja pnevmokokne okužbe (Jedrzejcas, 2001). Večina protiteles proti površinskim proteinom *S. pneumoniae* ima zaščitno vlogo, zato so ti antigeni uporabni pri razvoju novih cepiv (Jedrzejcas, 2001).

Na molekularni ravni pritrjevanje *S. pneumoniae* na celice nosnega dela žrela najverjetneje poteka prek specifičnega disaharida (N-acetil-D-glukozamin β 1-3 galaktoza), ki tvori del glikolipidnega receptorja na površini epitelnih celic (Catterall, 1999). Pnevkoknega liganda, ki se veže na specifični disaharid, še niso identificirali, toda ugotovili so, da se pnevmokoki vežejo na celice nosnega dela žrela in ta receptor le takrat, ko so v določeni morfološki fazi (Catterall, 1999).

Sev povzročitelja bolezni se v bolnika naseli v mesecu pred klinično okužbo (Catterall, 1999). Raziskovalci so dokazali, da je delež pnevmokoknih okužb odvisen od tega, kako pogosto zdravi nosilci prenašajo invazivne serotipe. Kolonizacija se večinoma pojavi brez kasnejšega razvoja okužbe. Do kolonizacije lahko pride v urah po rojstvu in do dvanajstega dneva po rojstvu je delež nosilstva pnevmokokov pri otrocih podobna tisti pri njihovih materah. Delež nosilcev je najvišji pri predšolskih otrocih, pri odraslih pa je odvisen od pogostosti stika z otroki. V enem nosilcu so lahko hkrati tudi štirje različni serotipi, ki vztrajajo več mesecev. Posledica asimptomatske kolonizacije nosnega dela žrela s *S. pneumoniae* je pogosto izločanje specifičnih protiteles, ki omogočajo zaščito pred pljučnico s tem serotipom. Kaže, da vdihavanje kolonizirajočega organizma v prvih tednih vodi k pljučnici, kasneje pa je večina zdravih odraslih najverjetneje zaščiten (Catterall, 1999).

2.8 PREHOD IZ KOLONIZACIJE DO PLJUČNICE IN INVAZIVNE BOLEZNI

Dejavniki, ki omogočajo pnevmokokom širjenje prek nosnega dela žrela, so slabo opredeljeni in so verjetno odvisni od virulence organizma, stanja gostiteljevega imunskega sistema in morebitne predhodne virusne okužbe (Catterall, 1999). Do širjenja v pljuča verjetno pride z vdihovanjem bakterije, pomaga tudi oslabitev refleksa za kašljanje, povečano izločanje sluzi (v kateri se pnevmokok množi) in oslabitev migetalčnega epitelija. Čeprav je vse to lahko posledica z gostiteljem povezanih motenj, sam pnevmokok prispeva k manjšanju migetalčne aktivnosti in s pnevmolizinom slabi epitelijske spoje, ki so nujni za izločanje normalne sluzi. Tako virus gripe kot adenovirus okrepi pritrjevanje celic *S. pneumoniae* na celice epitelija in vitro. Pnevkok se lahko pritrjuje tudi na

človeške bronhialne celice. Pri zdravih posameznikih so bronhiji sterilni, toda pri bolnikih s kroničnim bronhitisom je organizem lahko prisoten v spodnjih dihalih tudi med posameznimi poslabšanji. Razumevanje tega tipa kolonizacije je še slabo, ravno tako odnosi med tem in akutnimi poslabšanji pri kronični obstruktivni pljučni bolezni (KOPB). Poskuse za vrednotenje vloge *S. pneumoniae* ovirata prisotnost kolonizirajočih organizmov v nosnem delu žrela in v spodnjih dihalih ter pomanjkanje standardne definicije akutnega poslabšanja pri KOPB (Catterall, 1999).

V alveolih se pnevmokoki sprva pritrdijo na alveolarno steno, verjetno na alveolarne celice tipa II (Catterall, 1999). Zelo hitro se širijo tudi v kri, kar kaže na zmožnost, da prečkajo žilne endotelne celice (Catterall, 1999). K pritrditvi *S. pneumoniae* na pljučne celice tipa II in žilne endotelne celice pripomore gostiteljev celični glikokonjugatni receptor s specifičnimi disaharidi (N-acetil-D-glukozamin β 1-4 galaktoza ali N-acetil galaktozamin β 1-3 galaktoza) kot minimalnimi receptorskimi podenotami. Ti galaktozni disaharidi so podobni, toda vseeno se razlikujejo od glukozaminskih disaharidnih receptorjev na epitelnih celicah nosnega dela žrela. Pnevmonokom vezavo na te glikokonjugate omogočata fosforilholin v celični steni in pnevmokokni proteini (Catterall, 1999). Raziskovalci so odkrili mnogo domnevnih proteinskih adhezinov, toda možno je, da jih veliko pri tej vlogi deluje le posredno (Catterall, 1999). Za prehod v invazivno bolezen je potrebno lokalno izločanje vnetnih faktorjev, kot sta TNF (tumor nekrotizirajoči faktor) in interleukin 1 (IL-1) (Bogaert in sod., 2004). Ta vnetna kaskada spremeni tip in število receptorjev na tarčnih epitelnih in endotelnih celicah (Bogaert in sod., 2004). Aktivacija epitelnih celic in pljučnih celic s citokini je povezana s povečanim izražanjem receptorja PAF v primerjavi z neaktiviranimi celicami (Catterall, 1999). Ko postanejo endotelne celice aktivne, fosforilholin na pnevmokokni celični steni kaže veliko afiniteto za receptor PAF (Catterall, 1999; Bogaert in sod., 2004). Pnevmonokoki se povežejo s receptorjem PAF, sledi povečano pritrdjevanje pnevmokokov na celice in povečano potovanje skozi respiratorni epitelij in krvni endotelij, posledica česar je invazivnost živih bakterijskih celic (Catterall, 1999; Bogaert in sod., 2004). Samo virulentni pnevmokoki delujejo z receptorjem PAF in tak potek dogodkov bi se dalo in vitro in in vivo preprečiti z dodajanjem antagonistov, specifičnih za receptor PAF (Catterall, 1999). Raziskovalci menijo, da je to ključen korak pri prehodu od asimptomatske kolonizacije do invazivne bolezni (Catterall, 1999; Bogaert in sod., 2004).

2.9 RAZVOJ PLJUČNICE (IMUNOLOGIJA)

Prva histološka anomalija pri pnevmokokni pljučnici je nabreklost alveolov s tekočino z veliko vsebnostjo proteinov in rdečimi krvnimi celicami zaradi poškodb in povečane prepustnosti alveolokapilarne pregrade (Catterall, 1999). Pnevmonokoki krepijo strjevanje krvi, zato se tvori še fibrin. Posledica je manjši dotok krvi na prizadeto področje in nevtrofilcem je omogočeno, da ujamejo pnevmokoke na površino pljučnih celic.

Alveolarne epitelne celice tipa I, žilne endotelne celice in tesne stike med njimi lahko poškodujejo proizvodi pnevmokokne celične stene ali pnevmolizin, pripomore pa tudi gostiteljev TNF. Ti dogodki ne potrebujejo prisotnosti nevtrofilcev in tudi ni dokazov, da pri tem igra vlogo pnevmokokna kapsula. Odstranjevanje pnevmokokov iz alveolov s fagocitozo je odvisno od komplementa, pri čemer pomagajo tudi antikapsularna protitelesa. Alveolarni makrofagi imajo fagocitno vlogo med zgodnjo fazo okužbe, toda že po eni do dveh urah se jim pridružijo in kmalu tudi prevladajo učinkovitejši granulociti. Ti se zadržujejo v pljučnih kapilarah in potujejo v alveole le na mestu okužbe. V postopek so vključeni tudi faktor komplementa C-5a, ki se sprošča zaradi direktne aktivacije komplementa, ki jo sproži teihoična kislina v celični steni *S. pneumoniae*, ter interlevkin 8 in levkotrien B4, ki ju sproščajo alveolarni makrofagi. Postopek je neodvisen od selektinov in verjetno neodvisen tudi od adhezijskih molekul CD11–CD18, čeprav so dokazi za regulacijo teh molekul pri pljučnicah. Vzrok za neodvisnost od selektinov in CD11–CD18 je delno lahko v anatomskih razlikah med pljučnim in sistemskim kapilarnim sistemom ali verjetneje zaradi razlik med pnevmokoki in ostalimi bakterijami (Catterall, 1999).

Povečani potrebi po granulocitih v krvi in pljučih sledi povečano izločanje novih celic iz kostnega mozga (Catterall, 1999). Te celice so nezrele, večje in manj učinkovite kot zreli granulociti. Le manjši del nezrelih celic potuje v alveole, ostale ostanejo v pljučnem žilnem področju. Ko nezreli granulociti prejmejo ustrezen signal, je večja verjetnost, da sprostijo kisikove radikale in proteolitične encime kot dozorele celice. Ob pnevmokokni bakteriemiji pride do aktivacije teh celic, kar vodi v poškodbo pljuč. To pojasni visoko smrtnost, povezano z bakteriemijo pri pnevmokokni pljučnici. Vseeno je pri pnevmokokni pljučnici zanimivo, da se pljuča bolnikov, ko okrevajo po bolezni, vedno vrnejo v normalno stanje, in sicer ne glede na resnost sistemskega ali pljučnega stanja med vrhuncem bolezni. V povezavi s tem so odkrili, da so alveolarni makrofagi bolnikov s pljučnico manj dovzetni za stimulacijo in izločajo manj vnetnih citokinov kot pri zdravih osebah. Opazili so tudi, da žive bakterije *S. pneumoniae* v raztopini pri granulocitih inhibirajo izločanje reaktivnih kisikovih spojin, medtem ko *Staphylococcus aureus* in *Klebsiella pneumoniae* spodbujata izločanje reaktivnih kisikovih spojin. Pnevkokokna inhibicija oksidativnega izbruha pri nevtrofilcih pomaga razložiti, zakaj pnevmokoki redko povzročijo trajne poškodbe pljuč, medtem ko pljučnice, ki jih povzročata *S. aureus* in *K. pneumoniae*, pogosto spremlja nastanek abscesov in fibroze (Catterall, 1999).

2.10 BAKTERIEMIJA, PROTITELESA IN VLOGA VRANICE

Tveganje za bakteriemijo in smrt zaradi pnevmokokne pljučnice močno zmanjša prisotnost protiteles proti kapsuli v serumu (Catterall, 1999). Že zgodnji raziskovalci so pokazali, da je tvorba protiteles znanilec izboljšanja pri invazivni pnevmokokni okužbi. Prvo učinkovito zdravljenje pnevmokokne pljučnice je predstavljala pasivna imunizacija s specifičnim antiserumom. Protitelesa proti ostalim sestavnim delom pnevmokokov, npr.

polisaharidom celične stene, pnevmolizinu, PspA in ostalim proteinom, se med kolonizacijo ali okužbo ravno tako tvorijo, toda njihova zaščitna vloga je manjša (Catterall, 1999).

Med pnevmokokno okužbo se protitelesa tvorijo pozno v poteku razvoja gostiteljeve obrambe, večinoma peti ali šesti dan od začetka bolezni, in vse raziskave niso potrdile, da so specifična protitelesa nujna za uspešno obrambo. Do opsonofagocitoze *S. pneumoniae* pride tudi v odsotnosti specifičnih protiteles in ozdravitev bolnikov s pnevmokokno pljučnico, ki jih niso zdravili z antibiotiki, lahko nastopi še pred nastankom zaščitnih protiteles (Catterall, 1999). Nadalje so opazili bakteriemijo kljub prisotnosti visoke koncentracije specifičnih antikapsularnih protiteles. Ugotovili so, da uničenje pnevmokokov, ko ni specifičnih protiteles, temelji na retikuloendotelijskem sistemu, kjer makrofagi iz vranice igrajo pomembnejšo vlogo kot tisti iz jeter. To in vloga vranice pri okrepljeni izdelavi protiteles kaže na večje tveganje za umrljivost zaradi pnevmokokne bakteriemije pri bolnikih brez okvare vranice ali z njo (Catterall, 1999).

2.11 VLOGA CITOKINOV

Molekularni procesi in dogajanje v celicah, ki so del gostiteljevega obrambnega sistema, so nadzorovani s citokini (Catterall, 1999). To je omrežje polipeptidov z nizko molekulsko maso, ki jih izloča mnogo celic, med njimi tudi alveolarni makrofagi. Čeprav so citokini nujni kemijski posredniki v vnetnih in imunoloških procesih, so lahko tudi škodljivi. Raziskave kažejo, da je pomembno ravnovesje med vnetnimi citokini, npr. TNF- α in IL-1, in protivnetnimi citokini, npr. IL-10, saj so motnje v tem ravnovesju povezane s slabo prognozo. Z različnimi raziskavami so dokazali, da ob vdihanju bakterij *S. pneumoniae* sledi hiter citokinski odziv in da se koncentracija citokinov v pljučih poveča. Pokazali so tudi, da odziv s citokini ni omejen samo na pljuča. V serumu se med akutno fazo okužbe dihal poveča koncentracija IL-6 in G-CSF (angl. granulocyte-colony stimulating factor). Vseeno G-CSF, ki pripomore k povečanem sproščanju nevtrofilcev in kostnega mozga, med pljučnico izvira iz pljuč. Odnos med tipi citokinov in kliničnim razpletom bolezni še vedno ni popolnoma jasen, saj je delovanje citokinov zelo zapleteno in v kliničnih raziskavah obstaja veliko spremenljivk. Čas meritev od začetka okužbe, prisotnost proteinov, ki nase vežejo citokine, in tehnične težave s sproščanjem citokinov in vivo pripomorejo k zahtevni interpretaciji ter razlikam med rezultati posameznih raziskav. Raziskovalci so zaenkrat preučili le del citokinov. Slabost mnogih raziskav je tudi v tem, da so raziskovalci merili citokine v krvi, čeprav je njihov izvor in primarni imunski odziv v pljučih (Catterall, 1999).

2.12 KRONIČNA OBSTRUKTIVNA PLJUČNA BOLEZEN (KOPB)

Kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB) je kronično obolenje dihal. Za bolezen so značilni kratka sapa, kroničen kašelj ter povečano nastajanje sluzi in izpljunkov. Je pomemben vzrok obolenosti in smrtnosti. V Evropski uniji je KOPB, skupaj z astmo, tretji najpogostejši vzrok smrti (Siafakas in sod., 1995; WHO, 2014). V Sloveniji so nenalezljive bolezni vzrok za 88 % vseh smrti, od tega so kronične bolezni dihal vzrok za 3 % vseh smrti. Kronične bolezni dihal so peti najpogostejši vzrok smrti v Sloveniji (WHO, 2014). V ZDA nenalezljive bolezni predstavljajo 88 % vseh smrti. Kronične bolezni dihal predstavljajo 8 % vseh smrti in so tretji najpogostejši vzrok smrti (WHO, 2014). Glavna značilnost KOPB je prisotnost kronične omejitve pretoka zraka, ki se z leti počasi slabša (Siafakas in sod., 1995).

KOPB je opisan z zmanjšanim maksimalnim pretokom zraka pri izdihu in počasnim izdihom zraka iz pljuč (Siafakas in sod., 1995). To sta lastnosti, ki se v obdobju nekaj mesecev bistveno ne spreminjata. Dihalne poti imajo pri bolezni zmanjšan premer zaradi zadebeljenih sten, polnjenja s sluzjo in polnjenja malih dihalnih poti s tekočino (Siafakas in sod., 1995). Emfizem je definiran anatomsko s trajnim, uničujočim povečanjem malih dihalnih poti do pljučnih mešičkov (bronhiolov) brez očitne fibroze (Siafakas in sod., 1995). Pljučni mešički propadajo, med njimi nastajajo votlinice. Večji prostori, napolnjeni z zrakom, se imenujejo emfizemske bule. O kroničnem bronhitisu govorimo takrat, ko je prisotnost bronhialnih izločkov kronična ali ponavljajoča in povzroča izkašljevanje (Siafakas in sod., 1995). Izločki so prisotni večino dni vsaj tri mesece na leto v dveh zaporednih letih in jih ne moremo pripisati nobenemu drugemu vzroku (Siafakas in sod., 1995). Do pretiranega izločanja sluzi lahko pride tudi brez zmanjšane pretoka zraka (Siafakas in sod., 1995).

Akutna poslabšanja respiratornih simptomov so pogosta pri bolnikih s KOPB (apKOPB). Poslabšanja so povezana z večjo smrtnostjo, hospitalizacijo in drugim zdravstvenim varstvom (Rodriguez-Roisin, 2000). Bolnikom se pojavijo značilni znaki in simptomi, kot so težko dihanje, kašljanje z izkašljevanjem izmečka in vročina (Rodriguez-Roisin, 2000). Manj specifični znaki so lahko slabo počutje, utrujenost, nespečnost ali zaspanost in depresija (Rodriguez-Roisin, 2000). Čeprav je večina simptomov posledica oslabiljene pljučne funkcije, predvidevajo, da bolniki samo polovico vseh apKOPB poročajo zdravniku (Rodriguez-Roisin, 2000). Mehanizmi, ki pripeljejo do akutnih poslabšanj pri bolnikih s KOPB, niso povsem znani (Patel in sod., 2002). Zmanjšanje pogostosti poslabšanj bi imelo pomembne koristi. Zato je preprečevanje akutnih poslabšanj glavni cilj zdravljenja KOPB.

Ena od možnosti za trajno vnetje dihalnih poti je kronična mikrobna kolonizacija pljuč bolnikov s KOPB (Sethi in sod., 2006). Zdrava človeška pljuča so sterilna in več prirojenih

obrambnih mehanizmov pomaga vzdrževati sterilnost. Dejavniki tveganja za kolonizacijo z bakterijami vključujejo stopnjo okvare pljuč in kajenje, saj je večina bolnikov s KOPB kadilcev ali bivših kadilcev (Siafakas in sod., 1995). Preventiva z zmanjšanjem razširjenosti kajenja ostaja prednostna naloga zdravstva (Siafakas in sod., 1995). Vendar le 15 % kadilcev zboli s KOPB, kar kaže na to, da so za bolezen potrebni še drugi dejavniki, na primer podedovana občutljivost ali dodaten vnetni dejavnik (Sethi in sod., 2006). Kajenje verjetno zmoti te obrambne mehanizme in posledica je, da se mikroorganizmi lahko zadržujejo v spodnjih dihalih (Sethi in sod., 2006). Prisotnost bakterij v spodnjih dihalih bolnikov s KOPB kaže na neučinkovit odziv imunskega sistema s poškodbami epitelnih celic, oteženo čiščenje sluzi z migetalkami, povečano izločanje sluzi in infiltracijo vnetnih celic. Vse to vodi v še slabše delovanje imunskega odziva in olajšano bakterijsko pritrjevanje in širjenje (Patel in sod., 2002). Čeprav je večina poškodb pljuč že nepovratnih ob pojavu kliničnih znakov, lahko z zdravljenjem izboljšamo kakovost življenja in podaljšamo življenjsko dobo bolnikov s KOPB (Siafakas in sod., 1995).

Velik del bolnikov s KOPB ima spodnja dihala kolonizirana z različnimi patogeni, vključno z bakterijami *H. influenzae*, *S. pneumoniae* in *M. catarrhalis* (Patel in sod., 2002). Patel in sod. (2002) so poskusili ugotoviti povezavo med bakterijsko kolonizacijo v stabilnem obdobju pri bolnikih s KOPB in pogostostjo, značilnostmi in trajanjem poslabšanj. Ugotovili so, da približno 50 % bolnikov s KOPB v stabilnem stanju naseljuje vsaj en bakterijski patogen. V 53,3 % je to *H. influenzae* in v 33,3 % *S. pneumoniae*. Ostale bakterije so redkejšje. Bolniki, ki so bili kolonizirani s *H. influenzae*, so med poslabšanji imeli več simptomov in večje izločanje izmečka kot bolniki brez naseljenih bakterij. Ta raziskava je pokazala, da je *S. pneumoniae* eden od glavnih patogenov pri bolnikih s KOPB in da kolonizacija bakterij v spodnjih dihalih pri njih vpliva na pogostnost in značilnosti poslabšanj KOPB. Ugotovili so, da je bakterijska kolonizacija povezana z nevtrofilnim vnetjem lumna dihal (Patel in sod., 2002; Sethi in sod., 2006). Raziskovalci so dokazali, da imajo bolniki s pogostimi poslabšanji tudi v stabilnem stanju v izmečku večje količine interlevkina IL-6 in IL-8 kot bolniki z redkimi poslabšanji. To kaže, da imajo bolniki s pogostimi poslabšanji večjo pogostost bakterijske kolonizacije (Patel in sod., 2002).

2.13 LABORATORIJSKA DIAGNOZA

Invazivno pnevmokokno okužbo (bakteriemija, meningitis in druge pnevmokokne okužbe mest, ki so pri zdravih ljudeh sterilna) kljub pomembnosti presenetljivo težko diagnosticiramo (Werno in Murdoch, 2008). Izolacija bakterije *S. pneumoniae* iz primarno sterilnih mest je dokaz pnevmokokne okužbe, toda uspe pri le manjšem delu pnevmokoknih okužb. Pnevmonokna pljučnica je najpogostejša oblika pnevmokokne okužbe, toda za pravilno diagnosticiranje je zelo zahtevna. To je v večini primerov posledica slabe kakovosti vzorcev spodnjih dihal in težava razlikovanja med kolonizacijo

in okužbo. Predhodna uporaba antibiotikov močno zmanjša verjetnost za izolacijo pnevmokokov iz kliničnih vzorcev. Kljub pomembnosti pnevmokoknih okužb po celem svetu laboratorijska diagnostika za identifikacijo pnevmokokov v zadnjem času ni bistveno napredovala. Še vedno temelji na metodah, ki se uporabljajo že več desetletij (Werno in Murdoch, 2008). Trenutno uporabljani laboratorijski pristopi za ugotavljanje pnevmokokov so: mikroskopski pregled kužnin, kultivacija kužnin, hemokulture, testi za dokazovanje antigenov, testi za zaznavanje protiteles, testi pomnoževanja nukleinskih kislin, masna spektrometrija in biomarkerji.

2.13.1 Mikroskopski pregled kužnin

Laboratorijska identifikacija bakterije *S. pneumoniae* temelji na prepoznanju tipičnih morfoloških lastnosti in rezultatih nekaj fenotipskih testov. Razmaz, obarvan po Gramu, in kultura sta navadno prva diagnostična koraka pri laboratorijskem diagnosticiranju pljučnice. Med mikroskopskim vrednotenjem razmaza se *S. pneumoniae* kaže kot suličasto oblikovan po Gramu pozitiven diplokok ali kot koki, nanizani v verižico (Werno in Murdoch, 2008). Tipičen izgled lahko spremeni antibiotična terapija ali prekomerno razbarvanje razmaza, zaradi česar pnevmokoki izgledajo kot po Gramu negativni diplokokci. Čeprav se v sedanjosti malo uporablja, je reakcija nabrekanja pnevmokokne kapsule zelo specifična metoda za zaznavanje pnevmokokov v čisti kulturi ali v vzorcih izmečka. Po reakciji pnevmokokov s streptokoknim antikapsularnim serumom postane kapsula vizualno ojačena in bakterije izgledajo, kot da jih obdaja nekakšen sij. Kljub temu, da reakcijo nabrekanja pnevmokokne kapsule večinoma štejejo za visoko specifično za pnevmokoke, so poročali o navzkrižni reaktivnosti s polisaharidi drugih streptokokov, obenem sevi brez kapsule dajo lažno negativen rezultat (Werno in Murdoch, 2008).

Mikroskopski dokaz številnih po Gramu pozitivnih diplokokov v izmečku, ki vsebuje manj kot deset ploščatih celic epitelija in več kot 25 levkocitov na vidno polje pri majhni povečavi (stokratni), pri bolniku s pljučnico z veliko verjetnostjo kaže na pnevmokokno pljučnico. To dodatno potrди kultivacija, kadar je rast bakterije *S. pneumoniae* prevladujoča na gojišču z nacepljenim izmečkom (Werno in Murdoch, 2008). Izmečki slabe kakovosti, ki vsebujejo več kot deset celic ploščatega epitelija in manj kot 25 levkocitov na vidno polje, niso ustrezni za diagnostiko, saj so kontaminirani z izločki zgornjih dihal in bo na gojiščih verjetno porasla le komezalna flora ust in žrela (Werno in Murdoch, 2008; Tomič in Šorli, 2002). Vzpostavitev sistema vrednotenja izmečkov omogoča pomembno in poceni orodje, ki mikrobiološkemu laboratoriju omogoča vzdrževati klinično pomembne rezultate (Tomič in Šorli, 2002). Pri tem je pomembno poudariti, da na občutljivost razmaza, barvanega po Gramu, in zaznavanja pnevmokokov vpliva tudi različna usposobljenost tehnikov (Werno in Murdoch, 2008).

Z različnimi kliničnimi raziskavami so pokazali, da sta kultura in barvanje po Gramu še vedno pomembni metodi za diagnosticiranje pnevmokokne pljučnice, kadar so vzorci visoke kakovosti in so bili odvzeti pred antibiotično terapijo ali vsaj v 24 urah po začetku antibiotične terapije (Werno in Murdoch, 2008). Pokazali so, da izmečke visoke kakovosti lahko dobimo pri večjem delu odraslih bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico in da ima barvanje po Gramu za zaznavanje pnevmokokne pljučnice občutljivost 57 % in specifičnost 97 %. Za odrasle bolnike s pnevmokokno pljučnico in bakteriemijo imata kultura in barvanje izmečka po Gramu občutljivost med 80 % in 93 %, kadar je bil izmeček odvzet pred začetkom antibiotične terapije. Razlog za različno občutljivost kulture izmečka med različnimi raziskavami je lahko različna obdelava izmečka pred samo kulturo, nezadostna količina vzorca, nezmožnost bolnika za izkašljanje izmečka in začetek antibiotične terapije pred odvzemom vzorca (Werno in Murdoch, 2008).

2.13.2 Kultivacija in identifikacija

Po inkubaciji čez noč pri 35 °C in v atmosferi, obogateni s 5 % CO₂, na agarju s 5 % ovčje krvi ali čokoladnem agarju kolonije bakterije *S. pneumoniae* izgledajo majhne, sivkaste in sluzne (ne vsi pnevmokokni serotipi; serotipa 3 in 35 sta bolj sluzna kot ostali serotipi (Song in sod., 2013)), obdaja jih zelena cona α hemolize. Po 24–48 urah inkubacije kolonije postanejo na sredini vdrtne. Nadaljnja identifikacija je pomembna za potrditev identitete bakterij. Laboratorijsko razlikovanje med bakterijo *S. pneumoniae* in ostalimi zelenečimi streptokoki omogočata dve ključni reakciji: občutljivost za optohin in raztapljanje kolonij v žolču (Werno in Murdoch, 2008). Optohin (etilhidrokuprein) je protibakterijsko sredstvo, ki se ga ne uporablja za zdravljenje, ampak le za laboratorijsko identifikacijo streptokokov. Test raztapljanja v žolču temelji na avtolizi *S. pneumoniae* v prisotnosti Na-deoksiholata. Tipični izolati *S. pneumoniae* so občutljivi za optohin in se raztapljajo v žolču, medtem ko so ostali zeleneči streptokoki odporni proti optohinu in se ne raztapljajo v žolču. Čeprav se raztapljanje v žolču večinoma šteje za zelo občutljivo in specifično metodo za identifikacijo *S. pneumoniae*, je odkritje, da je kar 10 % izolatov *S. pneumoniae* odpornih proti optohinu, precej zmanjšalo opiranje na ta test. Zaradi tega bi bilo treba tudi seve, ki imajo zmanjšano občutljivost za optohin, testirati na topnost z žolčem. Komercialni testi lateksne aglutinacije, koagulacije in testi hibridizacije z DNK-sondami so alternativne metode za hitro identifikacijo izolatov *S. pneumoniae*. Vse te metode so visoko občutljive, toda občasno dajo lažno pozitivne rezultate z drugimi zelenečimi streptokoki (specifičnost od 85 % do 95 %) (Werno in Murdoch, 2008).

Laboratorijsko identifikacijo *S. pneumoniae* je dodatno otežilo odkritje *Streptococcus pseudopneumoniae* (Werno in Murdoch, 2008). *S. pseudopneumoniae* se fenotipsko in genetsko razlikuje od *S. pneumoniae* in ostalih zelenečih streptokokov, toda enostavno se ga napačno identificira kot *S. pneumoniae*. Ključne lastnosti *S. pseudopneumoniae* so odsotnost pnevmokokne kapsule, netopnost v žolču, odpornost ali slaba občutljivost za

optohin med inkubacijo v atmosferi, obogateni s 5 % CO₂, občutljivost za optohin med inkubacijo v zraku okolja in pozitivne reakcije s testi hibridizacije DNK in testi za zaznavanje pnevmokoknega antigena. Klinična pomembnost *S. pseudopneumoniae* je še nejasna, toda obstajajo povezave s KOPB (Werno in Murdoch, 2008).

2.13.3 Hemokulture

Klinična pomembnost pozitivnih hemokultur je bila ovrednotena z mnogimi raziskavami v preteklih desetletjih (Kirn in Weinstein, 2013). Uporabnost hemokultur za odkrivanje bakteriemije je močno odvisna od odvzema vzorcev bolnikov s sumom na bakteriemijo. Rutinsko nadzorno odzemanje vzorcev krvi za hemokulture vsem bolnikom je drago in ima le majhno klinično vrednost. Kadar je le možno, je bolnikom treba odvzeti dva do štiri vzorce krvi z različnih punkcij vene. Priporočljivo je, da za odrasle bolnike vzamemo vsaj dva vzorca; vsak naj vsebuje 20 mL krvi. Za najboljše odkrivanje različnih povzročiteljev bakteriemije mora vsak set hemokultur vsebovati parne aerobne in anaerobne hemokulturne stekleničke; aerobne hemokulturne stekleničke morajo biti napolnjene prve. V večini ustanov polne hemokulturne stekleničke dostavijo v laboratorij, kjer jih vstavijo v računalniško voden inkubator, ki ves čas spremlja bakterijsko rast v njih. Za večino organizmov priporočajo petdnevno inkubacijo hemokultur. Na tržišču je več proizvajalcev naprav za inkubacijo hemokultur, ki so po zmogljivosti podobne. Ko je enkrat hemokultura zaradi rasti mikroorganizmov pozitivna, je treba narediti razmaz, barvan po Gramu. Pozitiven gramski razmaz predstavlja kritičen podatek. Treba ga je takoj sporočiti lečečemu zdravniku. V laboratoriju se takrat naredi subkulture, ki omogočajo identifikacijo mikroorganizma, in po potrebi kasneje tudi test občutljivosti (Kirn in Weinstein, 2013).

Izolacija *S. pneumoniae* iz hemokulture omogoča dokončno diagnozo pnevmokokne okužbe. Vseeno se dokazana bakteriemija pojavi le pri majhnem deležu primerov pnevmokoknih okužb (Werno in Murdoch, 2008). Čeprav bakterija *S. pneumoniae* velja za najpogostejši vzrok zunajbolnišničnih pljučnic pri vseh starostnih skupinah, je delež pozitivnih hemokultur hospitaliziranih bolnikov s pljučnico navadno med 3 % in 8 %, pri otrocih še nižji. Pri pnevmokoknem meningitisu je dokazana bakteriemija pogostejša kot pri pljučnici in deleži pozitivnih hemokultur so pogosto višji od 50 %. Relativno nizek delež dokazane bakteriemije pri bolnikih s pnevmokokno okužbo je posledica več dejavnikov, vključno z antibiotično terapijo pred odvzemom krvi in širjenjem pnevmokokov v kri, ki ne poteka konstantno. Dodatno pnevmokoki sproščajo avtolizin med stacionarno fazo rasti, posledica česar je celična smrt. To močno otežuje klasične metode zaznavanja rasti bakterij v gojiščih, kot so hemokulture (Werno in Murdoch, 2008).

2.13.4 Testi za dokazovanje antigenov

Klasične mikrobiološke metode za odkrivanje pnevmokokne pljučnice imajo vsaj dve bistveni slabosti: prva je, da je kultura pogosto lažno negativna, druga pa, da čisto pnevmokokno kulturo dobimo šele po nekaj dneh (Song in sod., 2013). Pri dokazovanju antigenov se tema dvema slabostma vsaj delno izognemo. Začetek dokazovanja pnevmokoknih antigenov v kliničnih vzorcih, še zlasti v urinu, sega v leto 1917 (Werno in Murdoch, 2008). V zadnjih nekaj desetletjih so v širšo uporabo prišli komercialni testi lateksne aglutinacije za dokazovanje kapsularnih polisaharidnih antigenov bakterije *S. pneumoniae*, čeprav so mnenja o njihovi uporabi deljena (Werno in Murdoch, 2008). Različne ocene vzbujajo dvom o njihovi klinični uporabnosti in prednosti pred kultivacijo in barvanjem po Gramu (Werno in Murdoch, 2008). V raziskavah so dokazali visoko občutljivost testa lateksne aglutinacije za zaznavanje *S. pneumoniae* v likvorju, vendar je bila občutljivost enaka kot pri pregledu razmazov likvorja, obarvanih po Gramu (Werno in Murdoch, 2008). Vseeno so testi lateksne aglutinacije zelo uporabni za diagnostiko pnevmokokne pljučnice in meningitisa v skupnostih z omejenimi laboratorijskimi zmožnostmi (Werno in Murdoch, 2008).

Nedaven razvoj hitrega imunokromatografskega testa za zaznavanje C-polisaharidnega antigena celične stene, ki je prisoten pri vseh sevih *S. pneumoniae* (BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test, Alere, Waltham, ZDA), je obnovil zanimanje za zaznavanje antigenov (Werno in Murdoch, 2008). Test je končan v petnajstih minutah, zato je zelo primeren kot hitri diagnostični test pri bolnikih s pljučnico. V primerjavi s klasičnimi diagnostičnimi metodami za dokazovanje pnevmokokne pljučnice ima pri uporabi na vzorcih urina od 70- do 80-odstotno občutljivost in več kot 90-odstotno specifičnost (Werno in Murdoch, 2008). V meta-analizi 27 raziskav so ugotovili 74-odstotno občutljivost in 97,2-odstotno specifičnost testa BinaxNOW pri bolnikih s pnevmokokno pljučnico (Sinclair in sod., 2013). V vseh raziskavah so pokazali tudi, da ima del bolnikov s pozitivnimi hemokulturami ali pozitivnimi kulturami nacepljenega izmečka negativne rezultate testa BinaxNOW. Zato je treba test BinaxNOW uporabiti skupaj z drugimi metodami (Werno in Murdoch, 2008). Test lahko da pozitiven rezultat več tednov po okužbi in cepljenje proti pnevmokokom lahko da lažno pozitivne rezultate (Werno in Murdoch, 2008). Uporabnost testa BinaxNOW je vprašljiva pri otrocih, ki imajo zaradi kolonizacije nosnega dela žrela s pnevmokoki veliko lažno pozitivnih rezultatov. Druge omejitve testa so še relativno visoka cena in nezmožnost pridobitve podatkov o občutljivosti pnevmokoknega seva za antibiotike (Werno in Murdoch, 2008). Novejša poročila kažejo, da se test BinaxNOW lahko uporabi v podporo pri začetku zdravljenja z ozkospektralnimi betalaktamskimi antibiotiki in tako pomaga pri preprečevanju prekomerne uporabe širokospektralnih antibiotikov (Werno in Murdoch, 2008). Uporabnost testa so preučevali tudi pri bolnikih s stabilno KOPB in bolnikih z apKOPB (Nishimura in sod., 2012). S testom BinaxNOW so dobili podobne rezultate pri bolnikih z

apKOPB s pljučnico ali brez nje. Pogosto je test BinaxNOW negativen, medtem ko je izolacija iz izmečka pozitivna, kar lahko kaže na to, da rezultat testa ni odvisen od kolonizacije pnevmokokov in da pokaže pozitiven rezultat le pri pravi okužbi (Nishimura in sod., 2012).

Test BinaxNOW je namenjen testiranju urinskih vzorcev, vendar so ugotovili njegovo učinkovitost tudi pri uporabi na drugih vzorcih. Test je še zlasti uporaben za hitro diagnozo pnevmokoknega meningitisa z uporabo vzorcev likvorja. Občutljivost je bila 95–100 % in specifičnost 100 % (Werno in Murdoch, 2008). Test so uspešno uporabili tudi na vzorcih plevralne tekočine otrok in odraslih s pljučnico. V vzorcih bronhoalveolarne lavaže so s testom BinaxNOW dokazali pnevmokokni antigen z občutljivostjo 95 % in s specifičnostjo 87 % (Werno in Murdoch, 2008). S testom BinaxNOW lahko dobimo hitro potrditev bakterije *S. pneumoniae* v pozitivnih hemokulturah (Werno in Murdoch, 2008).

Ostale pnevmokokne antigene, zlasti pnevmolizin, so preučevali kot potencialne diagnostične tarče. V vzorcih urina in likvorja so iskali antigen pnevmolizin. Rezultati so bili obetavni, toda raziskovalci niso dokazali, da bi bili boljši od rezultatov testa BinaxNOW, ki zaznava polisaharid C (Werno in Murdoch, 2008). Možno je, da bi kombinacija testa ELISA, specifičnega za pnevmolizin, skupaj s testom BinaxNOW prinesla boljšo diagnostiko, še zlasti zaradi visoke specifičnosti testa ELISA za zaznavanje pnevmolizina (Werno in Murdoch, 2008).

2.13.5 Testi za zaznavanje protiteles

Zaznavanje pnevmokoknih protiteles ali imunskih kompleksov so uporabili za diagnozo pnevmokokne okužbe v nekaterih raziskavah, toda metode nikoli niso širše uporabljali (Werno in Murdoch, 2008). Testi imajo prenizko občutljivost in specifičnost, potrebno je relativno dolgo časovno obdobje, da lahko dokažemo serokonverzijo (Werno in Murdoch, 2008). Dolgotrajno vztrajanje specifičnih protiteles kljub antibiotični terapiji dela serološko analizo zanimivo za retrogradno etiološko diagnozo pnevmokokne okužbe in za epidemiološke namene (Klugman in sod., 2008).

Anti-PsaA ELISA je možna metoda za diagnosticiranje pnevmokokne pljučnice (Klugman in sod., 2008). Pri bolnikih z bakteriemično pnevmokokno pljučnico je dvakratno povečanje ELISA-enot anti-PsaA pri parnih serumih (v akutni fazi in v fazi okrevanja) imelo 85-odstotno občutljivost in 83-odstotno specifičnost (Klugman in sod., 2008). Test ima slabše rezultate pri vzorcih otrok, kjer je bila občutljivost precej nižja (Klugman in sod., 2008).

2.13.6 Testi pomnoževanja nukleinskih kislin

Testi pomnoževanja nukleinskih kislin s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction – PCR) so se izkazali kot pomembno diagnostično orodje in trenutno predstavljajo eno najboljših diagnostičnih metod. S testi PCR lahko zaznamo minimalne količine nukleinske kisline potencialnih patogenov, testi niso odvisni od preživetja tarčnih mikroorganizmov, antibiotična terapija ima na njih manjši vpliv kot na metode, ki temeljijo na kultivaciji, in rezultati testa so na voljo v kratkem času (Werno in Murdoch, 2008).

PCR pomnoži eno samo kopijo DNK večmilijonkrat. Pri tej tehniki vzorec inkubiramo z dvema kratkima oligomeroma DNK (imenovanima tudi začetna oligonukleotida ali primerja, ki sta komplementarna koncema znanega genetskega zaporedja znotraj celotne DNK), toplotno stabilno polimerazo DNK (Taq ali druge polimeraze, pridobljene iz termofilnih bakterij), nukleotidi in pufri (Murray in sod., 2005). Začetni oligonukleotidi se vežejo na ustrezno zaporedje enoverižne DNK in vzpostavijo mesto začetka pomnoževanja z DNK-polimerazo, ki prepriše del DNK. Sledi segrevanje reakcijske mešanice, da DNK denaturira (ločita se obe verigi dvojne vijačnice), nato sledi še hlajenje, ki omogoči začetnim oligonukleotidom, da hibridizirajo z novo DNK (Murray in sod., 2005). Vsaka kopija DNK postane predloga za novo reakcijo. Postopek ima veliko ponovitev (20–40) in originalno zaporedje DNK se pomnoži eksponentno. Tarčno zaporedje s to metodo lahko pomnožimo večmilijonkrat v vsega nekaj urah. PCR v realnem času so iznašli za določanje količine DNK v vzorcu (Murray in sod., 2005). Bistvo metode je v tem, da več kot je DNK v vzorcu, prej je nova DNK namnožena v reakciji PCR in kinetika reakcije je sorazmerna s količino DNK. Aparat za PCR v realnem času meri večanje količine dvojnovijačne DNK s povečevanjem fluorescence molekul, ki se vežejo na novo nastale dvojnovijačne molekule DNK (Murray in sod., 2005).

Testi pomnoževanja nukleinskih kislin imajo različno uspešnost pri dokazovanju pnevmokokne okužbe. Prva generacija testov PCR iz krvnih vzorcev pri odraslih s pljučnico je imela manjšo ali enako občutljivost kot hemokulture (Klugman in sod., 2008). Pri pljučnici ima PCR za dokazovanje *S. pneumoniae* v vzorcih krvi občutljivost od 29 do 100 %, pri čemer so rezultati testov boljši pri vzorcih otrok kot odraslih (Werno in Murdoch, 2008). Na splošno je slaba uspešnost testa PCR pri krvnih vzorcih lahko posledica hitre odstranitve pnevmokokov iz krvi ali napak pri vzorčenju zaradi premajhne količine vzorca, uporabljene za reakcijo PCR. Dodatno so pozitivne rezultate PCR-testa za zaznavanje pnevmokokov dobili tudi pri asimptomatskih kontrolnih osebah (Werno in Murdoch, 2008).

Pri testiranju izmečkov so bili rezultati testa PCR pri vzorcih bolnikov s pljučnico pozitivni med 68 in 100 %, toda ni jasno, koliko na rezultat vpliva kolonizacija v zgornjih dihalih

(Werno in Murdoch, 2008). Dodatno težavo povzroča gen za pnevmolizin (*ply*), ki je pogosta tarča reakcije PCR in ki je pogost v nekaterih nepnevmokoknih zelenečih streptokokih (Werno in Murdoch, 2008). Dodatno izpopolnjeni testi PCR vsebujejo začetne oligonukleotide za več tarč, kar jim poveča specifičnost (Werno in Murdoch, 2008). Testi, ki vsebujejo začetne oligonukleotide za gen *lytA*, imajo verjetno prednost pred ostalimi testi (Werno in Murdoch, 2008). Raziskovalci so dokazali, da je PCR-test *lytA* občutljivejši kot zaznavanje polisaharida v urinu (Bandettini in Melioli, 2012). Nekateri raziskovalci predlagajo uporabo kvantitativnih testov PCR v realnem času, s katerimi bi lažje ločili med kolonizacijo in okužbo, saj je pri okužbi prisotno precej večje število bakterij kot pri kolonizaciji. Ta pristop še ni povsem ovrednoten, toda poročila kažejo spodbudne rezultate (Werno in Murdoch, 2008). Z uporabo gena *ply* in mejno vrednostjo več kot $3,7 \times 10^4$ kopij na mL kakovostnega izmečka so ugotovili občutljivost 90 % in specifičnost 80 % (Klugman in sod., 2008). V drugi raziskavi so z uporabo začetnih oligonukleotidov za isti gen pri vrednosti več kot 10^5 kopij gena *ply* na mL izmečka dobili višjo občutljivost kot pri kultivaciji (Klugman in sod., 2008). Drugi raziskovalci so kot tarčo uporabili delček gena Spn9802, ki se je pri vrednosti več kot 10^4 kopij na mL vzorca aspirata nosnega dela žrela ujemal s klinično boleznijo (Abdeldaim in sod., 2008). V raziskavah so kot tarčo testa PCR uporabljali tudi pnevmokokni površinski antigen A (Morrison in sod., 2000) in kapsularni polisaharidni biosintezni gen (*cpsA*) (Park in sod., 2010).

Obstajajo dokazi, da se oblika in resnost bolezni ujemata z rezultati PCR v realnem času, ki povejo količino pnevmokokov v kliničnih vzorcih (Klugman in sod., 2008). Pri bolnikih s pnevmokoknim meningitisom je koncentracija pnevmokokne DNK v krvi in likvorju povezana s smrtnostjo. Kvantitativni PCR v realnem času s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi je obetavna metoda za odkrivanje bolnikov, ki potrebujejo antibiotično zdravljenje pljučnice (Klugman in sod., 2008).

2.13.7 Masna spektrometrija

Metoda MALDI-TOF MS (angl. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) prihaja v kliničnih mikrobioloških laboratorijih v rutinsko uporabo za identifikacijo bakterij iz čiste kulture (Bandettini in Melioli, 2012). Masna spektrometrija je hitro, učinkovito in občutljivo analitično orodje za razlikovanje, identifikacijo in opredelitev bakterijskih patogenov. Še zlasti MALDI-TOF pogosto uporabljajo za analizo celih bakterijskih celic, ki niso bile ne kemično ne mehansko obdelane (Bandettini in Melioli, 2012). S to tehniko lahko ustvarijo proteomske profile in ti lahko služijo kot proteinski biomarkerji, ki so uporabni za diagnostične namene (Bandettini in Melioli, 2012). Proteomsko profiliranje je alternativa biokemični in genomski identifikacijski shemi. MALDI-TOF MS lahko uporabimo tudi za diagnosticiranje pozitivnih hemokultur.

Tehnologija ima potencial, saj zmanjša stroške in čas do rezultata bakterijske identifikacije (Bandettini in Melioli, 2012).

Uspešnost MALDI-TOF MS za identifikacijo rodu *Streptococcus* je zaradi precejšnje medsebojne sorodnosti in podobnosti večinoma slaba in zato MALDI-TOF za identifikacijo *S. pneumoniae* ni primeren. Potrebne so še nadaljnje raziskave za izboljšanje razlikovanja med pnevmokoki in tesno sorodnimi zelenečimi streptokoki, na primer *S. mitis* (Bandettini in Melioli, 2012).

2.13.8 Biomarkerji

Biomarkerji so objektivno izmerjene biološke učinkovine, ki se lahko uporabljajo kot označevalci. Izhajajo iz normalne ali patološke biološke poti, lahko pa tudi iz farmakološkega odziva na določen poseg (Dupuy in sod., 2013). Koncentracija učinkovin med akutno fazo pljučnice se poveča kot odziv na okužbo, vnetje in poškodbe tkiva. Te snovi so lahko uporabne kot biomarkerji, s katerimi je možno razlikovati med bakterijsko okužbo in neinfektivnim vzrokom bolezni ter tudi predvidevati prognozo bolezni in terapevtske možnosti (Song in sod., 2013). Prednost biomarkerjev je ta, da so rezultati na voljo zelo hitro. Pogosto uporabljena biomarkerja sta CRP (angl. C-reactive protein) in prokalcitonin, obetavne rezultate dajejo tudi TREM-1 (angl. triggering receptor expressed on myeloid cells), suPAR (angl. soluble urokinase-type plasminogen receptor), proADM (proadrenomedullin) in presepsin (Dupuy in sod., 2013). Kot možne biomarkerje preučujejo tudi mnoge različne vnetne citokine, npr. IL-6, IL-8 in IL-1Ra (Holub in sod., 2013).

Koncentracija CRP (protein, ki ga med akutno fazo sintetizirajo jetra) lahko hitro naraste med akutno okužbo ali vnetjem (Song in sod., 2013). CRP se veže na fosfoholinske ostanke pnevmokokne teihoične ali lipoteihoične kisline in lahko sproži kaskado komplemента (Song in sod., 2013). Prokalcitonin izločajo parafolikularne celice ščitnice in neuroendokrine celice pljuč in prebavil kot odziv na vnetne dražljaje bakterijskega izvora (Song in sod., 2013). Trenutno je največ kliničnih podatkov o CRP in prokalcitoninu. Raziskave kažejo, da so lahko serumske vrednosti CRP, večje od 120 mg/L, in vrednosti prokalcitonina, večje od 5 ng/L, koristne pri odkrivanju pnevmokokne pljučnice pri otrocih z nespecifičnimi spremembami na rentgenskih slikah pljuč (Song in sod., 2013). Povišane vrednosti prokalcitonina se dobro ujemajo s pozitivnimi rezultati testov PCR, serologijo in rentgenskimi slikami pljuč, ne pa tudi s pozitivnimi rezultati testa BinaxNOW *S. pneumoniae* pri otrocih (Song in sod., 2013). Drugi raziskovalci so vrednotili prokalcitonin in CRP kot pokazatelja pnevmokoknega vzroka pljučnice pri hospitaliziranih otrocih. Povišane vrednosti obeh biomarkerjev so bile močno povezane s pnevmokokno pljučnico. Občutljivost prokalcitonina je bila 94,4 % in za CRP 91,9 % (Song in sod., 2013). Koncentracija prokalcitonina, večja ali enaka 1,5 ng/mL, skupaj s pozitivnim

pnevmokoknim urinarnim antigenom kaže na 80-odstotno diagnostično verjetnost pnevmokokne pljučnice (Song in sod., 2013).

Tako pri otrocih kot tudi pri odraslih je določanje koncentracije CRP in prokalcitonina koristno za ločevanje bakterijske pljučnice od virusne (Song in sod., 2013). Poleg vsega so vrednosti prokalcitonina pri odraslih s pnevmokokno pljučnico višje kot pri tistih z drugim bakterijskim povzročiteljem pljučnice (Song in sod., 2013). Koncentracija prokalcitonina je povezana tudi z resnostjo pljučnice (Song in sod., 2013). Kljub vsemu biomarkerjev ne bi smeli uporabljati samostojno pri ločevanju med bakterijsko ali virusno pljučnico. V kombinaciji z drugimi metodami zaznavanja pnevmokokov biomarkerji močno povišajo specifičnost diagnoze pnevmokokne pljučnice (Song in sod., 2013).

Po svetu veliko truda vlagajo v iskanje novih diagnostičnih biomarkerjev, ki bi bili v pomoč pri vodenju antibiotične terapije pri akutnih okužbah. TREM-1 je član imunoglobulinske družine, uravnavajo ga mikrobní produkti in spodbuja izločanje več citokinov in kemokinov (Song in sod., 2013). Serumski TREM-1 so povezali z bakteriemično pljučnico in topni TREM-1 v bronhoalveolarni lavaži z bakterijsko pljučnico (Song in sod., 2013).

SuPAR je zelo razširjen receptor vnetnega odziva. Najdemo ga na epiteljskih celicah in levkocitih. SuPAR se močneje izraža med vnetnim in imunskim odzivom kot tudi med tumorsko rastjo (Dupuy in sod., 2013).

Pro-ADM je 52 aminokislin dolg peptid, ki deluje kot mediator celične proliferacije, regulacije hormonov in embriogeneze. Izločanje pro-ADM se poveča med imunskim odzivom na virusno ali bakterijsko okužbo (Dupuy in sod., 2013).

Presepsin je glikoproteinski receptor, ki ga najdemo na površini monocitov oz. makrofagov. Aktivacijo presepsina sprožijo bakterijski produkti (Dupuy in sod., 2013).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 BOLNIKI IN ODVZEM KUŽNIN

V Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik (UKPBA) smo za potrebe doktorske disertacije v obdobju enega leta (od aprila 2013 do aprila 2014) zbrali vzorce spodnjih dihal in urina 320 bolnikov, hospitaliziranih v UKPBA. Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko je na seji 26. novembra 2013 ocenila, da je raziskava etično sprejemljiva, in izdala svoje soglasje.

3.2 KULTIVACIJA RESPIRATORNIH KUŽNIN

Pri kultivaciji respiratornih vzorcev smo se osredotočili na zaznavanje bakterije *S. pneumoniae*. Delali smo po rutinskem postopku Laboratorija za respiratorno mikrobiologijo Klinike Golnik. Vsem sprejetim respiratornim vzorcem smo makroskopsko ocenili gnojnost. Nato smo naredili razmaz kužnine in ga obarvali po Gramu. Kakovost vzorca smo ocenili glede na vsebnost celic ploščatega epitelija in levkocitov s pomočjo mikroskopa (Eclipse E600, Nikon, Tokio, Japonska) pod stokratno povečavo. Izmečke smo ocenili kot neustrezne, če so vsebovali več kot deset celic ploščatega epitelija. Kakovostno neustreznih izmečkov nismo vključili v našo raziskavo. Neustreznih izmečkov je bilo 37 %.

Izmečke, aspirate traheje in aspirate tubusa smo prelili v sterilne 15 mL velike centrifugirke, nanje nalili pufersko raztopino N-acetil L-cisteina v razmerju 1 : 1, jih vorteksirali in pustili stati pri sobni temperaturi dvajset minut. Zatem smo homogenizirane izmečke ponovno vorteksirali, jih razredčili v fiziološki raztopini (0,1 mL homogeniziranega izmečka v 4,9 mL fiziološke raztopine). Kalibrirano bakteriološko zanko (10 μ l) razredčene kužnine smo zasadili na obogateni krvni agar. Bronhoskopske vzorce smo brez predhodne homogenizacije redčili v tioglikolatnem gojišču (0,1 mL bronhoskopskega vzorca v 9,9 mL tioglikolatnega gojišča). Nato smo 0,1 mL tioglikolatnega gojišča zasadili na obogateni krvni agar. Gojišča smo inkubirali 18 do 24 ur v atmosferi, obogateni s 5 % CO₂ pri 35 °C.

Po inkubaciji smo porasle alfa-hemolitične kolonije precepili na ploščo TSA (Trypticase Soy Agar (TSA II), BD, New Jersey, ZDA) s 5 % ovčje krvi. Na zasajene plošče smo položili optohinski disk (Taxo P Discs, BD). Plošče smo inkubirali 24 ur v atmosferi, obogateni s 5 % CO₂ pri 35 °C. Po inkubaciji smo izmerili cono zavrte rasti okoli optohinskega diska. Če je bil premer cone zavrte rasti okoli optohinskega diska štirinajst milimetrov ali več, smo kolonije identificirali kot *S. pneumoniae*. Poleg testa občutljivosti za optohin smo pri vseh alfa-hemolitičnih kolonijah izvedli test lateksne aglutinacije (Slidex Pneumo-Kit, BioMerieux, Francija) za potrditev identifikacije bakterije *S. pneumoniae*. V

primeru neujemajočih se rezultatov testa lateksne aglutinacije in testa občutljivost za optohin smo izvedli test AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* (Gen-Probe, Kalifornija, ZDA).

3.3 IDENTIFIKACIJSKI TEST AccuProbe *Streptococcus pneumoniae*

S testom AccuProbe *S. pneumoniae* (Gen-Probe, Kalifornija, ZDA) smo želeli ugotoviti prisotnost bakterije *S. pneumoniae* v kulturi zasajenih respiratornih kužnin. Test temelji na zaznavanju odseka RNA, specifičnega za bakterijo *S. pneumoniae*.

Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. Odpipetirali smo 50 µL reagenta 1 (Lysis Reagent) v testno epruveto. Več alfaemolitičnih kolonij, ki so po 18–24 urni inkubaciji porasle na gojiščih, zasajenih z redčenimi respiratornimi vzorci, smo dodali reagentu 1 in homogenizirali. Dodali smo 50 µL reagenta 2 (Hybridization Buffer) in homogenizirali. Testne epruvete smo inkubirali petnajst minut pri 60 °C. Zatem smo dodali 300 µL reagenta 3 (Selection Reagent) in homogenizirali. Inkubirali smo še pet minut pri 60 °C. Testne epruvete smo ohladili na sobno temperaturo in rezultat odčitali na luminometru. Rezultati, višji od 50.000 RLU, so pomenili, da so testirane alfaemolitične kolonije resnično *S. pneumoniae*.

3.4 TEST BinaxNOW *S. pneumoniae*

BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card (Alere, Massachusetts, ZDA) je hitri imunokromatografski test za kakovostno zaznavanje antigena bakterije *S. pneumoniae* v urinskih vzorcih bolnikov s sumom na pljučnico. Urin, hranjen pri sobni temperaturi, moramo testirati v 24 urah. Urin, hranjen v hladilniku (2–8 °C), lahko testiramo najpozneje v 14 dneh.

Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. Testno ploščico smo tik pred izvedbo testa odvili in postavili na ravno površino. Priložen bris smo pomočili v urin in nato vstavili v spodnjo luknjico testne ploščice. Potisnili smo ga do zgornje luknjice, tako da je bila glavica brisa dobro vidna v zgornji luknjici. Bris smo pustili v tem položaju in dodali tri kapljice reagenta A v spodnjo luknjico. Takoj nato smo zlepili oba dela testne ploščice. Rezultat smo odčitali po petnajstih minutah. Pozitivni rezultat preiskave smo dobili, ko sta se tako testna črta kot tudi kontrolna črta pobarvali rožnato. Za pozitiven rezultat smo šteli vsako vidno črto. Negativen rezultat preiskave smo dobili takrat, ko se je kontrolna črta pobarvala rožnato, testne črte pa ni bilo.

3.5 HEMOKULTURE

Z odvzemom in inkubacijo hemokultur smo ugotavljali prisotnost pnevmokokov v krvi. Hemokulture so bolnikom odvzeli po naročilu zdravnikov.

Stekleničke BACTEC plus Aerobic/F in BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F (BD) smo takoj po sprejemu v laboratorij vstavili v aparat BACTEC 9120 (BD). Inkubirali smo jih pet dni, aparat je avtomatsko odčitaval spremembe fluorescence vsakih deset minut. V primeru, da je aparat zaznal pozitivno hemokulturo, smo hemokulturno stekleničko odvzeli iz aparata in razmaz obarvali po Gramu. Kri smo zasadili na tri gojišča. Obogateni krvni agar in GC-agar (GC Agar Base, BD) smo inkubirali v atmosferi, obogateni s 5 % CO₂, pri 35 °C čez noč. Agar Brucella (Brucella Medium Base, Oxoid – Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA) smo inkubirali anaerobno pri 35 °C. Poraslo alfa-hemolitično bakterijsko kulturo smo identificirali z uporabo istih testov kot pri kultivaciji respiratornih vzorcev.

3.6 PCR ZA DOKAZ *S. pneumoniae* NEPOSREDNO V KUŽNINI

3.6.1 Izolacija DNK

DNK smo izolirali iz vseh respiratornih vzorcev z aparatom Nordiag Arrow (Nordiag Arrow/DiaSorin Liaison IXT, DiaSorin, Saluggia, Italija), ki omogoča avtomatizirano izolacijo nukleinskih kislin iz različnih kliničnih vzorcev s pomočjo tehnologije magnetnih kroglic. Za izolacijo smo uporabili komercialni komplet BUGS'n BEADS (DiaSorin). Kartuše tega kompleta so namenjene direktni izolaciji nukleinskih kislin bakterij in virusov iz različnih kliničnih vzorcev brez prehodne obdelave z encimi ali visoko temperaturo. Magnetne kroglice kompleta BUGS'n BEADS imajo posebno površino, na katero se v začetku postopka izolacije oprimejo različni po Gramu pozitivni in po Gramu negativni bakterije ter virusi. Kasneje v postopku aparat spere okoliško snov in doda raztopino za lizo celic. Nukleinske kisline se vežejo na magnetne kroglice. Nevezan zunajcelični material aparat na koncu postopka spere in ostane le izolat nukleinskih kislin.

Vzorci smo pripravili tako, da smo 100 µL respiratorne kužnine suspendirali v 2 mL pufra PBS. V 1,5 mL veliko mikrocentrifugirko smo prenesli 700 µL suspendirane kužnine. Močno viskozne izmečke smo predhodno obdelali, in sicer smo vzorcu dodali mešanico 2 % NALC + NaOH ter ga vorteksirali eno minuto. Nato smo ga inkubirali petnajst minut pri sobni temperaturi, centrifugirali deset minut pri 8.000 rpm in nato odstranili supernatant. Dodali smo 2 mL pufra PBS, vorteksirali, centrifugirali deset minut pri 8.000 rpm in odstranili supernatant. Sediment smo resuspendirali v 700 µL pufra PBS.

Nadaljnji postopek je potekal v aparatu po izbranem programu Bugs'n Beads 2.0. Izbrali smo volumen vzorca (700 μ L) in izolata (100 μ L). Na ustrezno mesto v aparatu smo vstavili črpalko z nastavkom in kartušo Bugs'n Beads. Kartušo smo preluknjali s kovinskim luknjačem. Vstavili smo vzorec in označeno mikrocentrifugirko za zbiranje izolata DNK. Po končanem programu smo odstranili mikrocentrifugirke z izolatom DNK in jih do uporabe shranili pri -20°C .

3.6.2 In-house hkratni PCR

Pripravo in-house hkratnega testa PCR, specifičnega za bakterijo *S. pneumoniae*, smo opisali v predhodno objavljenem članku (Lužnik in sod., 2015). S testom smo bili zadovoljni, zato smo ga uporabili tudi v nadaljevanju raziskave doktorske disertacije. Test smo pripravili z uporabo začetnih oligonukleotidov, ki so bili objavljeni in ovrednoteni v strokovnih člankih (Preglednica 1).

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v verižni reakciji s polimerazo

Table 1: Primers used in polymerase chain reaction

Začetni oligonukleotid	Zaporedje (5' -> 3')	Dolžina PCR produkta (bp)	Vir
<i>cpsA</i> -382F	ACGCAACTGACGAGTGTGAC	350	Park in sod. (2010)
<i>cpsA</i> -735R	GATCGCGACACCGAACTAAT	350	Park in sod. (2010)
<i>lytA</i> -F	ACGCAATCTAGCAGATGAAGC	101	McAvin in sod. (2001)
<i>lytA</i> -R	TGTTTGGTTGGTTATTCGTGC	101	McAvin in sod. (2001)
16S-rRNA -F	TCAAATGAATTGACGGGGGC	478	Prere in sod. (2011)
16S-rRNA -R	GGCCCGGGAACGTATTCAC	478	Prere in sod. (2011)

Par začetnih oligonukleotidov *cpsA* je oblikovan na osnovi 492 bp dolgega dobro ohranjenega zaporedja gena *cpsA*. Dolžina produkta PCR je 350 bp (Park in sod., 2010). Zaporedje za par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za gen *lytA*, je izbran iz 901 bp dolge dobro ohranjene regije gena *lytA*. Začetna oligonukleotida znotraj gena *lytA* nalegata na mesti od 306 bp do 326 bp in od 386 bp do 406 bp (McAvin in sod., 2001). Kot interno kontrolo smo vključili v reakcijo par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za gen za malo ribosomsko podenoto RNK (16S-rRNA) (Prere in sod., 2011). Reakcijsko mešanico in pogoje reakcije PCR smo pripravili po navodilih proizvajalca reakcijske mešanice (PCR Master Mix (2 x), Fermentas/Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA).

50 μ L reakcijske zmesi je vsebovalo naslednje sestavine:

25 μ L PCR Master Mix (2 x)

0,4 μ M koncentracije obeh začetnih oligonukleotidov

14 μ L vode

5 µL genomske DNK

PCR-reakcije smo izvedli na aparatu Thermocycler T3000 (Biometra GmbH, Goettingen, Nemčija). Verižno reakcijo pomnoževanja DNK v realnem času smo začeli s tremi minutami denaturacije pri 95 °C. Sledilo je 40 ciklov, sestavljenih iz:

- denaturacije 30 sekund pri 95 °C,
- prileganja 30 sekund pri 52 °C,
- podaljševanja 40 sekund pri 72 °C.

PCR smo zaključili z desetimi minutami podaljševanja verige DNK pri 72 °C in ohlajanjem na 4 °C.

PCR-produkte smo pregledali z agarozno gelsko elektroforezo na predpripravljenih dva odstotnih agaroznih gelih E-gel (Invitrogen/Life Technologies, Kalifornija, ZDA). Poleg produktov PCR smo na gel nanegli tudi lestvico 100 bp (Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA), ki vsebuje deset enakomerno razporejenih fragmentov dolžine 100 bp do 1000 bp.

Vzorci, pri katerih na gelu ni bilo lise za interno kontrolo, smo zamrznili in ponovili test PCR. Če tudi po ponovljeni reakciji na gelu ni bilo lise interne kontrole, smo vzorcem pripisali neveljaven rezultat.

3.6.3 In-house PCR v realnem času

In-house PCR v realnem času, pripravljen po principu TaqMan in specifičen za bakterijo *S. pneumoniae*, smo pripravili z uporabo začetnih oligonukleotidov in fluorescenčno označenih sond, ki so bili objavljeni in ovrednoteni v strokovnih člankih (Preglednica 2).

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi in fluorescenčno označeni sonde, uporabljeni v verižni reakciji s polimerazo v realnem času

Table 2: Primers and probes used in real-time polymerase chain reaction

Začetni oligonukleotid	Zaporedje (5' -> 3')	Dolžina PCR produkta (bp)	Vir
<i>lytA</i> -F	ACGCAATCTAGCAGATGAAGC	101	McAvin in sod. (2001)
<i>lytA</i> -R	TGTTTGGTTGGTTATTCGTGC	101	McAvin in sod. (2001)
Bak-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	466	Nadkarni in sod. (2002)
Bak-R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	466	Nadkarni in sod. (2002)
Sonda			
<i>lytA</i> -probe	Cy5-TTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGG	/	McAvin in sod. (2001)
Bak-probe	FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	/	Nadkarni in sod. (2002)

Zaporedje za par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za gen *lytA*, in fluorescenčno označeno sondo smo izbrali iz 901 bp dolge dobro ohranjene regije gena *lytA*. Začetna oligonukleotida znotraj gena *lytA* nalegata na mesti od 306 bp do 326 bp in od 386 bp do 406 bp. Fluorescenčna sonda, označena z barvilom Cy5, je nalegala na gen *lytA* od mesta 330 do 354 (McAvin in sod., 2001). Kot interno kontrolo smo vključili par začetnih oligonukleotidov in sondo širokega spektra Bak. Ta set začetnih oligonukleotidov in sonde so raziskovalci določili s poravnavo zaporedij genov 16S rRNA večine poznanih bakterijskih skupin in izbire najustreznejšega zaporedja s pomočjo ustrezne programske opreme (Nadkarni in sod., 2002).

Reakcijsko mešanico in pogoje PCR-reakcije v realnem času smo pripravili po navodilih proizvajalca reakcijske mešanice Maxima Probe qPCR Master Mix (2 x) (Fermentas/Thermo Scientific, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Za vsak vzorec smo pripravili dve reakcijski mešanici in izvedli dve reakciji PCR. V prvi smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za *S. pneumoniae*, in v drugi začetne oligonukleotide širokega bakterijskega spektra.

25 µL reakcijska zmes je vsebovala naslednje sestavine:

- 12,5 µL Maxima Probe qPCR Master Mix (2 x)
- 0,4 µM koncentracije obeh začetnih oligonukleotidov
- 0,2 µM koncentracije označene sonde
- 7,5 µL vode
- 2,5 µL genomske DNK

PCR v realnem času smo izvedli na aparatu Cepheid Smartcycler (Cepheid, Kalifornija, ZDA). Verižno reakcijo pomnoževanja DNK v realnem času smo začeli z desetimi minutami denaturacije pri 95 °C. Sledilo je 40 ciklov, sestavljenih iz:

- denaturacije 15 sekund pri 95 °C,
- prileganja 30 sekund pri 60 °C,
- podaljševanja 30 sekund pri 72 °C.

Vzorci, pri katerih ni bilo rezultata interne kontrole, smo zamrznili in ponovili test qPCR. Če tudi po ponovljeni reakciji ni bilo rezultata interne kontrole, smo vzorcu pripisali neveljaven rezultat.

3.7 BAKTERIJSKI SEVI

Za vrednotenje analitične specifičnosti PCR-testov in za končno izbiro najbolj specifičnih začetnih oligonukleotidov smo uporabili različne izolate skupine zelenečih streptokokov: *Streptococcus constellatus* (1), *Streptococcus mitis* (3), *Streptococcus oralis* (4), *Streptococcus salivarius* (2), *Streptococcus intermedius* (4), *Streptococcus sanguinis* (3),

Streptococcus vestibularis (1) in *Streptococcus parasanguis* (2). Te alfa-hemolitične streptokokne izolate smo osamili iz kliničnih respiratornih vzorcev. Bili so odporni proti optohinu (Taxo P Discs, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, ZDA) in imeli negativen test lateksne aglutinacije (Slidex Pneumo-Kit, BioMerieux, Francija). Seve smo identificirali s komercialno dostopnim identifikacijskim testom BBL™ Crystal™ Gram Positive ID Kit (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, ZDA). Uporabili smo tudi dvajset izolatov bakterije *S. pneumoniae*, ki smo jih osamili iz hemokultur in so bili shranjeni kot del arhiva hemokulturnih izolatov, ki ga vzdržujemo v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo Klinike Golnik. Izolate smo imeli shranjene v vialah Microbank z nosilci (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada) pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vse izolate bakterije *S. pneumoniae* smo identificirali z že prej opisanimi rutinskimi laboratorijskimi testi (občutljivost za optohin, pozitiven aglutinacijski test, pozitiven hibridizacijski test AccuProbe *S. pneumoniae*).

3.8 BAKTERIJSKA SUSPENZIJA

Za določitev spodnje meje zaznave tarčnih genov smo pripravili vzorce z znano količino bakterij *S. pneumoniae*. Pri pripravi suspenzije v fiziološki raztopini z znano količino bakterij smo za osnovo vzeli standard McFarland, kjer vrednost 0,5 McFarlanda predstavlja 1×10^8 CFU/mL. Z redčenjem osnovne suspenzije smo dobili redčitveno vrsto od 1×10^8 CFU/mL do 1×10 CFU/mL. Redčenja bakterijske suspenzije smo združili tudi z dokazano negativnim izmečkom. Tako smo dobili vzorce izmečka, ki so vsebovali od 1×10^8 CFU/mL do 1×10 CFU/mL.

3.9 STATISTIČNA OBDELAVA

Dokazovanje prisotnosti pnevmokokov je zahtevno tudi zaradi tega, ker ni metode, ki bi jo lahko uporabili kot zlati standard za računanje občutljivosti in specifičnosti. Zato smo občutljivost in specifičnost, skupaj z odgovarjajočimi intervali zaupanja, v odsotnosti zlatega standarda izračunali z uporabo Bayesovega modela računanja verjetnosti (Keith in sod., 2012) s kombinacijo binarnih vrednosti vseh uporabljenih metod zaznavanja povzročitelja. Bayesov model računanja verjetnosti smo izvedli v programu WinBUGS (Lunn in sod., 2000).

Kot pri vseh Bayesovih modelih smo definirali model verjetja (verjetnost podatkov (binarnih vrednosti testov) pri določenih vrednostih vstopnih podatkov (občutljivost in specifičnost testov); za oblikovanje modela verjetja smo uporabili Bernoullijevo distribucijo). Nato smo uporabili Bayesovo formulo pogojne verjetnosti, da smo prek predhodne verjetnosti vstopnih parametrov (vhodni parametri (občutljivosti, specifičnost, prevalenca) so bili za vse teste definirani enotno oz. po najboljšem vedenju iz literature, če smo imeli te podatke) in verjetja podatkov ob teh parametrih izračunali naknadno

verjetnost vhodnih parametrov. Iz dobljenih distribucij smo vzorčili (10.000 ponovitev) z metodo Markov Chain Monte Carlo ter s pomočjo teh vzorcev dobili robno naknadno prerazporeditev verjetnosti vhodnih parametrov (Priloga D).

Občutljivost smo opredelili kot verjetnost pozitivnega rezultata testa pri vzorcih, ki vsebujejo bakterijo *S. pneumoniae*. Specifičnost smo opredelili kot verjetnost negativnega rezultata testa pri vzorcih, ki ne vsebujejo bakterije *S. pneumoniae*.

Ostala obdelava podatkov je bila izvedena v programih R (R Core Team, Dunaj, Avstrija) in MS Excel (Microsoft, Redmond, ZDA). Deleže smo med seboj primerjali s testom Hi-kvadrat (z Yatesovim popravkom za kontinuiteto, kjer je bilo potrebno). Intervale zaupanja za deleže smo izračunali kot binominalne intervale zaupanja za deleže.

4 REZULTATI

4.1 BOLNIKI

Zbrali smo vzorce naključno izbranih 320 bolnikov, ki so glede na klinične podatke ustrezali kriterijem za vključitev v raziskavo (hospitalizacija bolnikov zaradi zunajbolnišnične pljučnice, apKOPB ali drugih bolezni). Vsi bolniki so bili odrasli (povprečna starost 68,8 leta, razpon od 21 do 95 let, 183 moških, 137 žensk). Glede na klinične podatke smo bolnike razdelili v tri skupine. V skupini bolnikov, hospitaliziranih zaradi zunajbolnišnične pljučnice, je bilo 106 bolnikov (povprečna starost 71,8 leta, razpon od 28 do 95 let, 55 moških, 51 žensk). Zunajbolnišnična pljučnica je bila diagnosticirana glede na anamnezo, klinično sliko, izsledke rentgenske preiskave in laboratorijske preiskave (kazalci vnetja: CRP, povišani levkociti, pri nekaterih tudi PCT). V skupini bolnikov z apKOPB je bilo 55 bolnikov (povprečna starost 73,8 leta, razpon od 55 do 89 let, 42 moških, 13 žensk). apKOPB je bilo določeno po kriterijih po Anthonisenu (Anthonisen in sod., 1987), ki zahtevajo tri simptome: povečanje dispneje, povečanje količine izmečka in povečanje gnojnosti izmečka. V skupini bolnikov brez bakterijske okužbe (v nad. druge bolezni) je bilo 159 bolnikov (povprečna starost 65,0 leta, razpon od 21 do 93 let, 86 moških, 73 žensk). Pri vseh bolnikih v tej skupini smo izvedli celotno diagnostiko in pri nobenem nismo odkrili bakterijske okužbe. Razlogi za hospitalizacijo bolnikov brez bakterijske okužbe so bili: akutni bronhitis (34 bolnikov), rak pljuč (22 bolnikov), intersticijska bolezen (20 bolnikov), astma (9 bolnikov), srčna odpoved (8 bolnikov), pljučna granulomatoza (7 bolnikov), organizirajoča pljučnica (6 bolnikov), cistična fibroza (5 bolnikov), respiratorna odpoved (4 bolniki), druge, manj pogoste diagnoze (44 bolnikov). Večina bolnikov je produktivno izkašljevala. Pri 320 bolnikih smo odvzeli 11 aspiratov traheje, 17 aspiratov tubusa, 3 aspirate z zaščitenim katetrom, 29 vzorcev mini BAL, 222 izmečkov, 38 izpirkov bronha in 285 vzorcev urina. Odvzeli smo tudi 91 hemokultur, večinoma pri bolnikih s pljučnico. Brisov nosnega dela žrela nismo odvzeli, saj se je v pilotni raziskavi izkazalo, da so vzorci slabe kakovosti (pogoste prisotne po Gramu negativne bakterije pri kroničnih bolnikih).

4.2 KULTIVACIJA VZORCEV IZ SPODNJIH DIHAL

Na gojišča smo nacepili 317 vzorcev spodnjih dihal, odvzetih istemu številu bolnikov. Pri treh bolnikih, vključenih v raziskavo, kultivacije vzorcev iz spodnjih dihal nismo izvedli. Bakterijo *S. pneumoniae* nam je uspelo osamiti v dvajsetih primerih. Izmed 105 vzorcev bolnikov s pljučnico so pnevmokoki porasli iz enajstih vzorcev (10,5 %). Izmed 55 vzorcev bolnikov z apKOPB nam je pnevmokoke uspelo izolirati v enem (1,8 %) primeru. Kultivirali smo tudi 157 vzorcev bolnikov brez bakterijske okužbe in dobili osem pozitivnih rezultatov (5,1 %). S kultivacijo respiratornih kužnin smo uspeli pri 105 bolnikih z diagnosticirano pljučnico dokazati bakterijskega povzročitelja v 44 primerih; v

dveh primerih smo odkrili pridruženo okužbo. V enajstih nacepljenih respiratornih kužninah smo izolirali *S. pneumoniae*, v desetih enterobakterije, v desetih *H. influenzae*, v devetih primerih *S. aureus* (MSSA), v štirih primerih *Pseudomonas aeruginosa*, v enem primeru *H. parainfluenzae* in v enem primeru bakterijo *M. catarrhalis*.

Preglednica 3: Rast *Streptococcus pneumoniae* iz respiratornih kužnin

Table 3: Isolation of *Streptococcus pneumoniae* from respiratory samples

	Rast <i>S. pneumoniae</i> iz respiratornih kužnin		
	Št. vzorcev	Pozitivni rezultati	%
Pljučnica	105	11	10,5
apKOPB	55	1	1,8
Druge bolezni	157	8	5,1
Skupaj	317	20	6,3

4.3 IDENTIFIKACIJSKI TEST AccuProbe *Streptococcus pneumoniae*

Kulturo, ki je porasla na gojiščih, nacepljenih z respiratornimi kužninami, smo testirali z identifikacijskim testom AccuProbe *Streptococcus pneumoniae*. Gojiščem, kjer bakterije niso porasle ali kjer niso porasle alfa-hemolitične kolonije, smo pripisali negativen rezultat. Pri 36 bolnikih testa AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* zaradi premalo bakterijske kulture nismo izvedli. Test smo izvedli 284-krat in dobili 25 pozitivnih rezultatov. Pri bolnikih s pljučnico smo testirali 93 bakterijskih kultur in dobili enajst pozitivnih rezultatov (11,8 %). Pri skupini bolnikov z apKOPB smo test izvedli 51-krat in dobili dva pozitivna rezultata (3,9 %). Pri bolnikih brez bakterijske okužbe smo test izvedli 140-krat in dobili dvanajst pozitivnih rezultatov (8,6 %).

Preglednica 4: Rezultati identifikacijskega testa AccuProbe *Streptococcus pneumoniae*

Table 4: Results of the AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* culture identification test

	AccuProbe iz kulture		
	Št. vzorcev	Pozitivni rezultati	%
Pljučnica	93	11	11,8
apKOPB	51	2	3,9
Druge bolezni	140	12	8,6
Skupaj	284	25	8,8

4.4 BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae*

S komercialnim testom BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* smo testirali 285 vzorcev urina istega števila bolnikov. Od 35 bolnikov, vključenih v našo raziskavo, vzorcev urina

nismo pridobili. Skupno smo dobili 22 pozitivnih rezultatov. V skupini bolnikov s pljučnico smo testirali 92 vzorcev urina. Ugotovili smo osemnajst pozitivnih vzorcev (19,6 %). V skupini bolnikov z apKOPB smo testirali 47 vzorcev urina. Pri tej skupini nismo ugotovili nobenega pozitivnega rezultata. Od tretje skupine bolnikov brez bakterijske okužbe smo dobili 146 vzorcev urina. Rezultat testa BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* je bil pozitiven štirikrat (2,7 %).

Preglednica 5: Rezultati testa BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae*

Table 5: Results of the BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* assay

	BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i>		
	Št. vzorcev	Pozitivni rezultati	%
Pljučnica	92	18	19,6
apKOPB	47	0	0
Druge bolezni	146	4	2,7
Skupaj	285	22	7,7

4.5 IN-HOUSE HKRATNI PCR

Z in-house hkratnim PCR-testom, specifičnim za *S. pneumoniae*, smo preverjali prisotnost pnevmokoka v 320 vzorcih iz spodnjih dihal. Pri 56 vzorcih smo dobili neveljaven rezultat. Pri ostalih 264 vzorcih smo dobili devetnajst (7,2 %) pozitivnih rezultatov. Izmed 91 testiranih vzorcev bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico smo dobili trinajst (14,3 %) pozitivnih rezultatov. Izmed 49 testiranih vzorcev bolnikov z apKOPB smo dobili štiri (8,2 %) pozitivne rezultate. Z in-house hkratnim PCR-testom smo testirali tudi 124 vzorcev bolnikov brez bakterijske okužbe. Dobili smo dva (1,6 %) pozitivna rezultata.

Preglednica 6: Rezultati in-house hkratnega PCR-testa, specifičnega za *Streptococcus pneumoniae*

Table 6: Results of the in-house multiplex PCR assay specific for *Streptococcus pneumoniae*

	In-house hkratni PCR		
	Št. vzorcev	Pozitivni rezultati	%
Pljučnica	91	13	14,3
apKOPB	49	4	8,2
Druge bolezni	124	2	1,6
Skupaj	264	19	7,2

4.6 IN-HOUSE PCR V REALNEM ČASU

Z in-house PCR v realnem času, specifičnem za bakterijo *S. pneumoniae*, smo preverjali prisotnost pnevmokoka v 320 vzorcih iz spodnjih dihal. Dobili smo 51 (15,9 %) pozitivnih rezultatov. Izmed 106 testiranih vzorcev bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico smo dobili 32 (30,2 %) pozitivnih rezultatov. Izmed 55 testiranih vzorcev bolnikov z apKOPB smo dobili pet (9,1 %) pozitivnih rezultatov. Z in-house qPCR-testom smo testirali tudi 159 vzorcev bolnikov, hospitaliziranih zaradi neinfektivnih razlogov. Dobili smo štirinajst (8,8 %) pozitivnih rezultatov.

Preglednica 7: Rezultati in-house qPCR-testa specifičnega za *Streptococcus pneumoniae*

Table 7: Results of the in-house real-time PCR assay specific for *Streptococcus pneumoniae*

	In-house qPCR		
	Št. vzorcev	Pozitivni rezultati	%
Pljučnica	106	32	30,2
apKOPB	55	5	9,1
Druge bolezni	159	14	8,8
Skupaj	320	51	15,9

4.7 HEMOKULTURE

Od 91 odvzetih setov hemokultur jih je bilo pozitivnih le osem, od tega je bil *S. pneumoniae* osamljen v štirih primerih. O odvzemu hemokultur so se odločali kliniki. Hemokulture so bile vzete 54 bolnikom s pljučnico in vse štiri izolate *S. pneumoniae* smo osamili v tej skupini bolnikov. Pri treh izmed štirih bolnikov, ki so imeli pozitivne hemokulture, smo ugotovili tudi pozitivna testa BinaxNOW in qPCR.

4.8 OPTIMIZACIJA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

4.8.1 Testiranje analitične specifičnosti dveh protokolov PCR

In-house hkratni PCR smo že med pilotno raziskavo (Lužnik in sod., 2015) izvedli na znanih sevih *S. pneumoniae*. PCR-test smo šteli kot pozitiven na *S. pneumoniae*, če je bila reakcija pozitivna pri obeh začetnih oligonukleotidih. Specifično liso za *lytA* in *cpsA* na agaroznem gelu smo dobili pri vseh dvajsetih sevih. Vseh dvajset sevov zelenečih streptokokov je imelo negativen rezultat z začetnim oligonukleotidom *cpsA*. Specifične lise za *lytA* so bile prisotne pri petih nepnevmokoknih sevih zelenečih streptokokov: *S. mitis* (3/3), *S. oralis* (1/4) in *S. intermedius* (1/4). Na streptokoknih kulturah izračunana občutljivost obeh začetnih oligonukleotidov je bila 100 %, specifičnost začetnih oligonukleotidov *cpsA* in *lytA* je bila 100 % in 75 %.

Seve *S. pneumoniae* in seve zelenečih streptokokov smo testirali tudi z in-house qPCR-testom, specifičnim za *S. pneumoniae*. Vseh dvajset sevov *S. pneumoniae* je bilo pozitivnih s tem testom in vseh dvajset sevov zelenečih streptokokov je bilo negativnih. Na streptokoknih kulturah izračunana občutljivost in specifičnost za in-house qPCR sta bili 100 %.

Preglednica 8: Rezultati testiranja specifičnosti hkratnega PCR in PCR v realnem času

Table 8: Results of the multiplex PCR and real-time PCR specificity testing

Zap. št.	ID Crystal	Hkratni PCR	PCR v realnem času
1	<i>S. mitis</i>	lytA+	neg
2	<i>S. salivarius</i>	neg	neg
3	<i>S. intermedius</i>	neg	neg
4	<i>S. parasanguis</i>	neg	neg
5	<i>S. sanguinis</i>	neg	neg
6	<i>S. vestibularis</i>	neg	neg
7	<i>S. sanguinis</i>	neg	neg
8	<i>S. intermedius</i>	neg	neg
9	<i>S. sanguinis</i>	neg	neg
10	<i>S. constellatus</i>	neg	neg
11	<i>S. oralis</i>	neg	neg
12	<i>S. mitis</i>	lytA+	neg
13	<i>S. oralis</i>	neg	neg
14	<i>S. oralis</i>	neg	neg
15	<i>S. salivarius</i>	neg	neg
16	<i>S. mitis</i>	lytA+	neg
17	<i>S. oralis</i>	lytA+	neg
18	<i>S. intermedius</i>	lytA+	neg
19	<i>S. intermedius</i>	neg	neg
20	<i>S. parasanguis</i>	neg	neg

Zap. št.		Hkratni PCR	PCR v realnem času
21	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
22	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
23	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
24	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
25	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
26	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
27	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
28	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
29	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
30	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
31	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
32	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
33	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
34	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
35	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
36	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
37	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
38	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
39	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz
40	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz

4.8.2 Ugotavljanje spodnje meje zaznave tarčne DNK z verižno reakcijo s polimerazo

Spodnjo mejo zaznave ključnih tarčnih genov smo določili z zaznavanjem pnevmokokne DNK v vzorcih z znano količino bakterij *S. pneumoniae*. PCR-teste smo izvedli na suspenziji z znano količino pnevmokokov in na dokazano negativnem izmečku, ki smo mu dodali znano količino bakterij *S. pneumoniae*.

Z in-house hkratnim PCR-testom smo dobili pozitiven rezultat, če je bilo v suspenziji vsaj 1×10^7 CFU/mL. Ko smo bakterijsko suspenzijo združili z dokazano negativnim izmečkom, smo ravno tako dobili pozitiven rezultat, če je bilo v vzorcu vsaj 1×10^7 CFU/mL.

Z in-house qPCR-testom, specifičnim za *S. pneumoniae*, smo dobili pozitiven rezultat, če je bilo v suspenziji vsaj 1×10^3 CFU/mL. Ko smo bakterijsko suspenzijo združili z dokazano negativnim izmečkom, smo dobili pozitiven rezultat, če je bilo v vzorcu vsaj 1×10^4 CFU/mL.

4.9 UJEMANJE METOD

4.9.1 Vsi bolniki

S kultivacijo in metodo AccuProbe *S. pneumoniae* smo testirali 284 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov. Rezultati kultivacije so se z rezultati metode AccuProbe ujemali pri 268 bolnikih (94,4 %); od 284 (100 %) bolnikov je 255 (89,8 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in trinajst (4,6 %) bolnikov je imelo z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed sedemnajstih (100 %) s kulturo pozitivnih bolnikov jih je imelo trinajst (76,5 %) pozitiven rezultat tudi z metodo AccuProbe, štirje (23,5 %) s kulturo pozitivni bolniki so bili z metodo AccuProbe negativni (Preglednica 9).

S kultivacijo in metodo BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* smo testirali 282 (100 %) vzorcev spodnjih dihal in urina istega števila bolnikov. Rezultati kultivacije so se z rezultati metode BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* ujemali pri 250 bolnikih (94,4 %); izmed 282 (100 %) bolnikov je 246 (87,2 %) imelo z obema metodama negativen rezultat, štirje (1,4 %) bolniki so imeli z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed osemnajstih (100 %) s kulturo pozitivnih bolnikov so imeli štirje (22,2 %) pozitiven rezultat tudi z metodo BinaxNOW *S. pneumoniae*, štirinajst (77,8 %) s kulturo pozitivnih bolnikov je bilo z metodo BinaxNOW *S. pneumoniae* negativnih (Preglednica 9).

S kultivacijo in in-house hkratnim PCR-testom smo testirali 263 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov. Rezultati kultivacije so se z rezultati in-house hkratnega PCR-testa ujemali pri 241 bolnikih (91,6 %); izmed 263 (100 %) je 236 (89,7 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in pet (1,9 %) bolnikov je imelo z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed trinajstih (100 %) s kulturo pozitivnih bolnikov jih je imelo pet (38,5 %) pozitiven rezultat tudi z in-house hkratnim PCR-testom in osem (61,5 %) s kulturo pozitivnih bolnikov je bilo z in-house hkratnim PCR-testom negativnih (Preglednica 9).

S kultivacijo in in-house qPCR-testom smo testirali 317 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov. Rezultati kultivacije so se z rezultati in-house qPCR-testa ujemali pri 271 bolnikih (85,5 %); izmed 317 bolnikov jih je 259 (81,7 %) imelo z obema metodama negativen rezultat in dvanajst (3,8 %) bolnikov je imelo z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed dvajsetih (100 %) s kulturo pozitivnih bolnikov jih je imelo dvanajst (60 %) pozitiven rezultat tudi z in-house qPCR-testom in osem (40 %) s kulturo pozitivnih bolnikov je bilo z in-house qPCR-testom negativnih (Preglednica 9).

Preglednica 9: Primerjava rezultatov kultivacije respiratornih vzorcev z rezultati testov AccuProbe, BinaxNOW *S. pneumoniae* in obema PCR-testoma
 Table 9: Comparison of cultivation with the AccuProbe, BinaxNOW *S. pneumoniae* assay and both PCR assays

	AccuProbe			BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i>			In-house hkratni PCR			In-house qPCR		
	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj
Kultura	255 (95,5 %)	12 (4,5 %)	267 (100 %)	246 (93,2 %)	18 (6,8 %)	264 (100 %)	236 (94,4 %)	14 (5,6 %)	250 (100 %)	259 (87,2 %)	38 (12,8 %)	297 (100 %)
	4 (23,5 %)	13 (76,5 %)	17 (100 %)	14 (77,8 %)	4 (22,2 %)	18 (100 %)	8 (61,5 %)	5 (38,5 %)	13 (100 %)	8 (40,0 %)	12 (60,0 %)	20 (100 %)

4.9.2 Bolniki z diagnozo pljučnica

S kultivacijo in metodo AccuProbe *S. pneumoniae* smo testirali 93 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico. Rezultati kultivacije so se z rezultati metode AccuProbe pri bolnikih s pljučnico ujemali pri 92 bolnikih (98,9 %); izmed 93 (100 %) nacepljenih vzorcev je 82 (88,2 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in deset (10,8 %) bolnikov je imelo z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed desetih (100 %) s kultivacijo pozitivnih bolnikov jih je imelo deset (100 %) pozitiven rezultat tudi z metodo AccuProbe. Niti enega pozitivnega bolnika ni bilo z metodo AccuProbe negativnega (Preglednica 10).

S kultivacijo in metodo BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* smo testirali 91 (100 %) vzorcev spodnjih dihal in urina istega števila bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico. Rezultati kultivacije pri vzorcih bolnikov s pljučnico so se z rezultati metode BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* ujemali pri 69 (75,8 %) bolnikih; izmed 91 (100 %) nacepljenih vzorcev je 66 (72,5 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in trije (3,3 %) bolniki so imeli z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed desetih (100 %) pozitivnih bolnikov so imeli trije (30,0 %) pozitiven rezultat tudi z metodo BinaxNOW *S. pneumoniae* in sedem (70,0 %) pozitivnih bolnikov je bilo z metodo BinaxNOW *S. pneumoniae* negativnih (Preglednica 10).

S kultivacijo in z in-house hkratnim PCR-testom smo testirali 90 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico. Rezultati kultivacije so se z rezultati in-house hkratnega PCR-testa ujemali pri 77 bolnikih (85,6 %); izmed 90 (100 %) nacepljenih vzorcev je 73 (81,1 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in štirje (4,4 %) bolniki so imeli z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed osmih (100 %) pozitivnih bolnikov so štirje (50,0 %) imeli pozitiven rezultat tudi z in-house hkratnim PCR-testom in štirje (50,0 %) pozitivni bolniki so bili z in-house hkratnim PCR-testom negativni (Preglednica 10).

S kultivacijo in in-house qPCR-testom smo testirali 105 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico. Rezultati kultivacije so se z rezultati in-house qPCR-testa ujemali pri 81 bolnikih (77,2 %); izmed 105 (100 %) nacepljenih vzorcev je 72 (68,6 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in devet (8,6 %) bolnikov je imelo z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed enajstih (100 %) pozitivnih bolnikov jih je imelo devet (81,8 %) pozitiven rezultat tudi z in-house qPCR-testom in dva (18,2 %) pozitivna bolnika sta bila z in-house qPCR-testom negativna (Preglednica 10).

Preglednica 10: Primerjava rezultatov kultivacije respiratornih vzorcev bolnikov s pljučnico z rezultati testov AccuProbe, BinaxNOW *S. pneumoniae* in obema PCR-testoma

Table 10: Comparison of cultivation of respiratory samples from CAP patients with the AccuProbe, BinaxNOW *S. pneumoniae* and both PCR assays

	AccuProbe			BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i>			In-house hkratni PCR			In-house qPCR		
	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj
neg	82 (98,8 %)	1 (1,2 %)	83 (100 %)	66 (81,5 %)	15 (18,5 %)	81 (100 %)	73 (89,0 %)	9 (11,0 %)	82 (100 %)	72 (76,6 %)	22 (23,4 %)	94 (100 %)
poz	0 (0 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	7 (70,0 %)	3 (30,0 %)	10 (100 %)	4 (50,0 %)	4 (50,0 %)	8 (100 %)	2 (18,2 %)	9 (81,8 %)	11 (100 %)

4.9.3 Bolniki z diagnozo apKOPB

S kultivacijo in metodo AccuProbe *S. pneumoniae* smo testirali 51 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z apKOPB. Rezultati kultivacije so se z rezultati metode AccuProbe pri bolnikih z apKOPB ujemali pri 49 bolnikih (96,1 %); izmed 51 (100 %) nacepljenih vzorcev je 49 (96,1 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat (Preglednica 11).

S kultivacijo in metodo BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* smo testirali 47 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z apKOPB. Rezultati kultivacije pri vzorcih bolnikov z apKOPB so se z rezultati metode BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* ujemali pri 46 (97,9 %) bolnikih; izmed 47 (100 %) nacepljenih vzorcev je 46 (97,9 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat. En sam (2,1 %) pozitiven bolnik je bil z metodo BinaxNOW *S. pneumoniae* negativen (Preglednica 11).

S kultivacijo in z in-house hkratnim PCR-testom smo testirali 49 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z apKOPB. Rezultati kultivacije so se z rezultati in-house hkratnega PCR-testa ujemali pri 46 (93,9 %) bolnikih; izmed 49 (100 %) nacepljenih vzorcev je 45 (91,8 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in en (2,0 %) bolnik je imel z obema metodama pozitiven rezultat (Preglednica 11).

S kultivacijo in z in-house qPCR-testom smo testirali 55 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z apKOPB. Rezultati kultivacije so se z rezultati in-house qPCR-testa ujemali pri 51 bolnikih (92,7 %); izmed 55 (100 %) nacepljenih vzorcev je 50 (90,9 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in en (1,8 %) bolnik je imel z obema metodama pozitiven rezultat (Preglednica 11).

Preglednica 11: Primerjava rezultatov kultivacije respiratornih vzorcev bolnikov z apKOPB z rezultati testov AccuProbe, BinaxNOW *S. pneumoniae* in obema PCR-testoma

Table 11: Comparison of cultivation of samples from AE COPD patients with the AccuProbe, BinaxNOW *S. pneumoniae* and with PCR assays

Kultura	AccuProbe			BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i>			In-house hkratni PCR			In-house qPCR		
	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj
neg	49 (96,1 %)	2 (3,9 %)	51 (100 %)	46 (100 %)	0 (0 %)	46 (100 %)	45 (93,8 %)	3 (6,2 %)	48 (100 %)	50 (92,6 %)	4 (7,4 %)	54 (100 %)
poz	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)	1 (100 %)

4.9.4 Bolniki, hospitalizirani zaradi drugih bolezni

Bolnike, hospitalizirane zaradi drugih bolezni, pri katerih smo ugotovili prisotnost bakterije *S. pneumoniae*, smo šteli kot kolonizirane s to bakterijo.

S kultivacijo in metodo AccuProbe *S. pneumoniae* smo testirali 140 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z drugimi boleznimi. Rezultati kultivacije so se z rezultati metode AccuProbe pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, ujemali pri 127 bolnikih (90,7 %); izmed 140 (100 %) nacepljenih vzorcev je 124 (93,2 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in trije (2,1 %) bolniki so imeli z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed sedmih (100 %) kulturo-pozitivnih bolnikov so trije (42,9 %) imeli pozitiven rezultat tudi z metodo AccuProbe in štirje (57,1 %) pozitivni bolniki so bili z metodo AccuProbe negativni (Preglednica 12).

S kultivacijo in metodo BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* smo testirali 144 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z drugimi boleznimi. Rezultati kultivacije pri vzorcih bolnikov, hospitaliziranih zaradi neinfektivnih razlogov, so se z rezultati metode BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* ujemali pri 135 (93,8 %) bolnikih; izmed 144 (100 %) nacepljenih vzorcev je 134 (93,1 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in en (0,7 %) bolnik je imel z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed sedmih (100 %) pozitivnih bolnikov je imel eden (14,3 %) pozitiven rezultat tudi z metodo BinaxNOW *S. pneumoniae* in šest (85,7 %) pozitivnih bolnikov je bilo z metodo BinaxNOW *S. pneumoniae* negativnih (Preglednica 12).

S kultivacijo in z in-house hkratnim PCR-testom smo testirali 124 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z drugimi boleznimi. Rezultati kultivacije so se z rezultati in-house hkratnega testa PCR ujemali pri 118 (95,2 %) bolnikih; izmed 124 (100 %) nacepljenih vzorcev je 118 (95,2 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat. Izmed štirih (100 %) pozitivnih bolnikov so vsi štirje (100,0 %) imeli negativen rezultat z in-house hkratnim testom PCR (Preglednica 12).

S kultivacijo in z in-house qPCR-testom smo testirali 157 (100 %) vzorcev istega števila bolnikov z apKOPB. Rezultati kultivacije so se z rezultati in-house qPCR-testa ujemali pri 139 (88,5 %) bolnikih; izmed 157 (100 %) nacepljenih vzorcev je 137 (87,3 %) bolnikov imelo z obema metodama negativen rezultat in dva (1,3 %) bolnika sta imela z obema metodama pozitiven rezultat. Izmed osmih (100 %) pozitivnih bolnikov jih je imelo šest (75,0 %) pozitiven rezultat tudi z in-house PCR-testom v realnem času in dva (25,0 %) pozitivna bolnika sta bila z in-house qPCR-testom negativna (Preglednica 12).

Preglednica 12: Primerjava rezultatov kulture, AccuProbe, BinaXNOW *S. pneumoniae* in obema PCR-testoma

Table 12: Comparison of cultivation of samples from patients hospitalised due to non-infectious reasons with the AccuProbe, BinaXNOW *S. pneumoniae* and both PCR assays

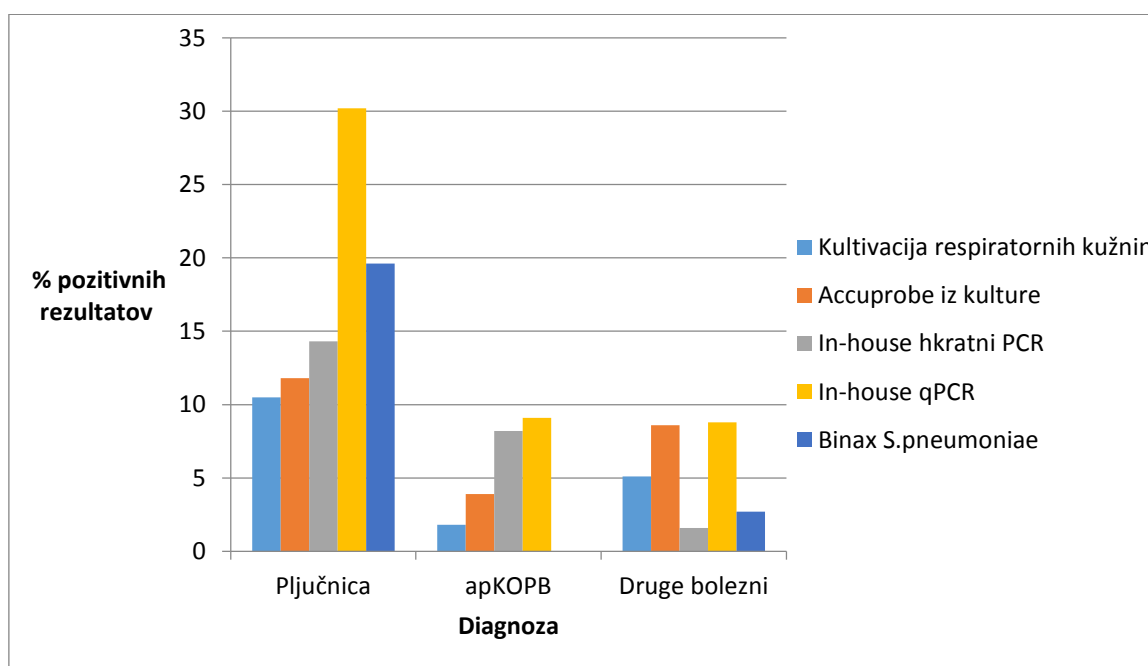
	AccuProbe			BinaXNOW <i>S. pneumoniae</i>			In-house hkratni PCR			In-house qPCR		
	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj	neg	poz	skupaj
neg	124 (93,2 %)	9 (6,8 %)	133 (100 %)	134 (97,8 %)	3 (2,2 %)	137 (100 %)	118 (98,3 %)	2 (1,7 %)	120 (100 %)	137 (91,9 %)	12 (8,1 %)	149 (100 %)
poz	4 (57,1 %)	3 (42,9 %)	7 (100 %)	6 (85,7 %)	1 (14,3 %)	7 (100 %)	4 (100 %)	0 (0 %)	4 (100 %)	6 (75 %)	2 (25 %)	8 (100 %)

4.10 PRIMERJAVA METOD

S petimi različnimi metodami, specifičnimi za bakterijo *S. pneumoniae*, smo testirali vzorce 320 bolnikov z različnimi diagnozami. Dobili smo od 19 do 51 pozitivnih rezultatov (oz. od 6,3 do 15,9 %) (Preglednica 13). Največ pozitivnih rezultatov smo z vsemi metodami dobili pri vzorcih bolnikov s pljučnico, saj je bilo od 10,5 % do 30,2 % vzorcev pozitivnih. Metoda, ki je najobčutljivejša in s katero smo dobili največ pozitivnih rezultatov, je in-house PCR v realnem času (Preglednica 13).

4.10.1 Primerjava metod po skupinah bolnikov

Primerjali smo tudi rezultate vseh petih metod, specifičnih za bakterijo *S. pneumoniae*, glede na skupino bolnikov (Slika 1). Največ pozitivnih rezultatov smo dobili pri vzorcih bolnikov s pljučnico, saj smo dobili od 10,5 % do 30,2 % pozitivnih rezultatov. Pri bolnikih z apKOPB smo dobili od 0 % do 9,1 % pozitivnih rezultatov in pri skupini bolnikov z drugimi boleznimi od 1,6 % do 10,0 % pozitivnih rezultatov.



Slika 1: Primerjava pozitivnih rezultatov vseh petih metod glede na skupino bolnikov

Figure 1: Comparison of positive results from all 5 methods depending on the group of patients

Preglednica 13: Primerjava pozitivnih rezultatov vseh petih metod
Table 13: Comparison of positive results from all 5 methods

Diagnoza	Kultivacija respiratornih kužnin			AccuProbe iz kulture			BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i>			In-house hkratni PCR			In-house qPCR		
	št. vzorcev	pozitivni rezultati	%	št. vzorcev	pozitivni rezultati	%	št. vzorcev	pozitivni rezultati	%	št. vzorcev	pozitivni rezultati	%	št. vzorcev	pozitivni rezultati	%
Pljučnica	105	11	10,5	93	11	11,8	92	18	19,6	91	13	14,3	106	32	30,2
apK OPB	55	1	1,8	51	2	3,9	47	0	0	49	4	8,2	55	5	9,1
Druge bolezni	157	8	5,1	140	12	8,6	146	4	2,7	124	2	1,6	159	14	8,8
Skupaj	317	20	6,3	284	25	8,8	285	22	6,9	264	19	7,2	320	51	15,9

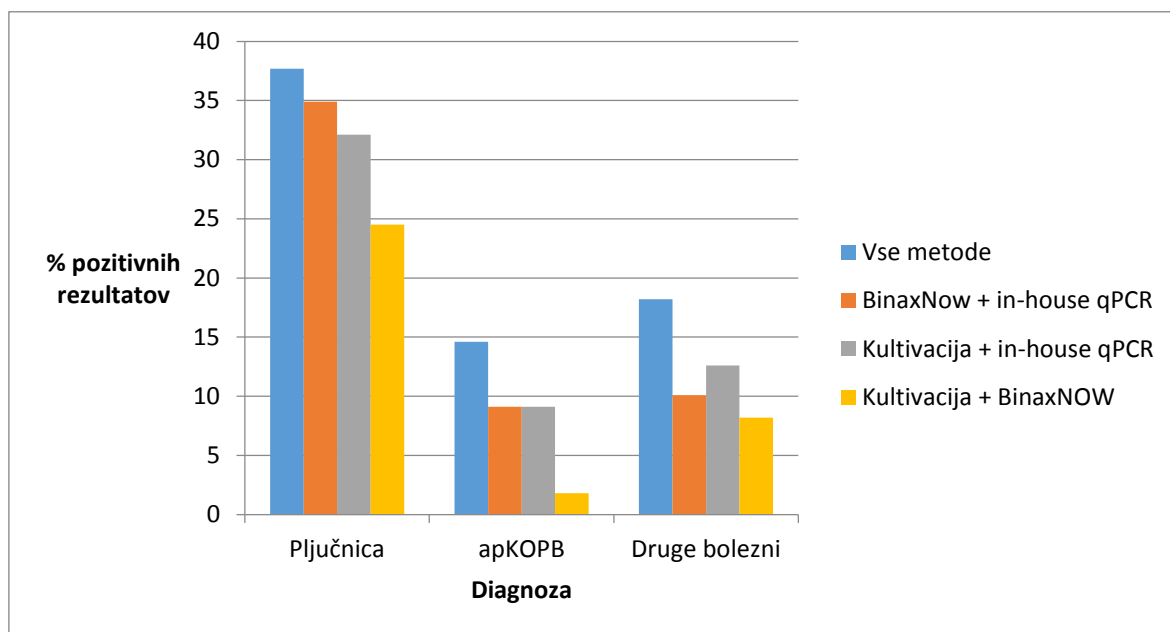
4.11 KOMBINACIJA METOD

S petimi različnimi metodami, specifičnimi za bakterijo *S. pneumoniae*, smo testirali vzorce 320 bolnikov z različnimi diagnozami. Če smo upoštevali pozitiven rezultat vsaj ene metode, smo dobili 77 (24,1 %) pozitivnih bolnikov. Ob upoštevanju pozitivnega rezultata vsaj ene metode smo dobili 40 (37,7 %) pozitivnih vzorcev pri bolnikih s pljučnico, osem (14,6 %) pozitivnih vzorcev pri bolnikih z apKOPB in 29 (18,2 %) pozitivnih vzorcev pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi neinfektivnih razlogov (Preglednica 14, Slika 2, Slika 3). Pozitivnih rezultatov je ob združevanju manjšega števila metod temu primerno manj. Ob upoštevanju pozitivnega rezultata qPCR in testa BinaxNOW *S. pneumoniae* smo dobili 37 (34,9 %) pozitivnih vzorcev pri bolnikih s pljučnico, pet (9,1 %) pozitivnih vzorcev pri bolnikih z apKOPB in šestnajst (10,1 %) pozitivnih vzorcev pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi neinfektivnih razlogov.

Preglednica 14: Primerjava pozitivnih rezultatov kombinacije metod

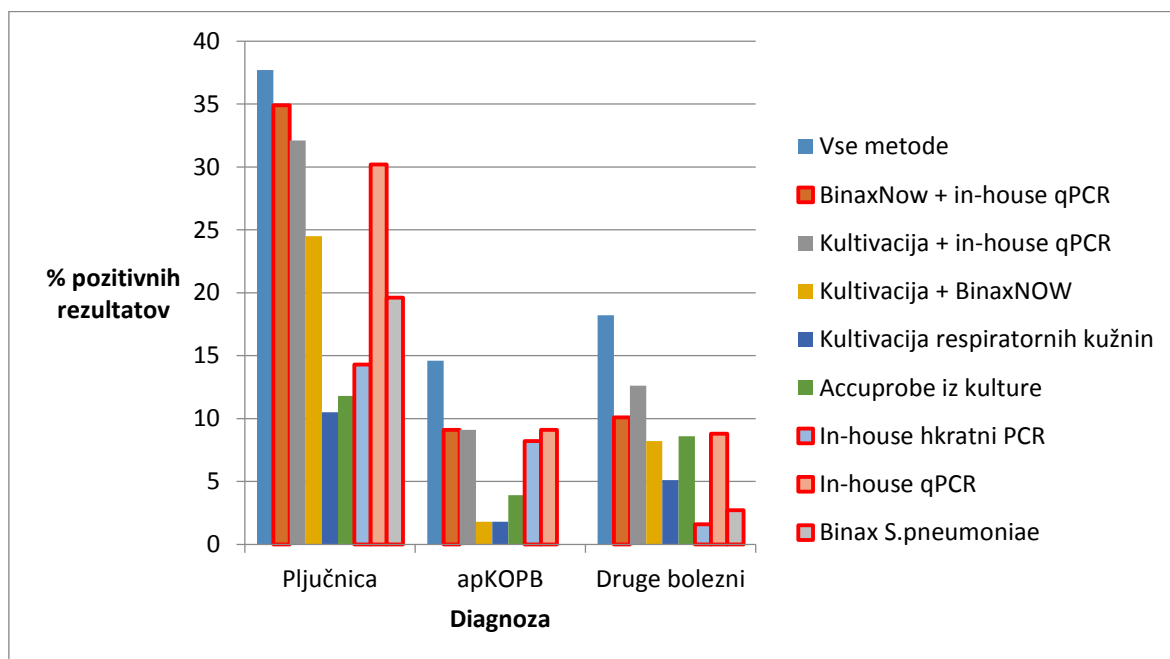
Table 14: Comparison of positive results from combination of methods

Diagnoza	Skupno št. vzorcev	Vse metode		BinaxNOW + qPCR		Kultivacija + qPCR		Kultivacija + BinaxNOW	
		Pozitivni rezultati	%	Pozitivni rezultati	%	Pozitivni rezultati	%	Pozitivni rezultati	%
Pljučnica	106	40	37,7	37	34,9	34	32,1	26	24,5
apKOPB	55	8	14,6	5	9,1	5	9,1	1	1,8
Druge bolezni	159	29	18,2	16	10,1	20	12,6	13	8,2
Skupaj	320	77	24,1	58	18,1	59	18,4	40	12,5



Slika 2: Primerjava pozitivnih rezultatov kombinacije metod

Figure 2: Comparison of positive results from combination of methods



Slika 3: Primerjava pozitivnih rezultatov različnih metod in kombinacije metod. Rdeče obrobljeni stolpci so rezultati, ki jih lahko dobimo v nekaj urah

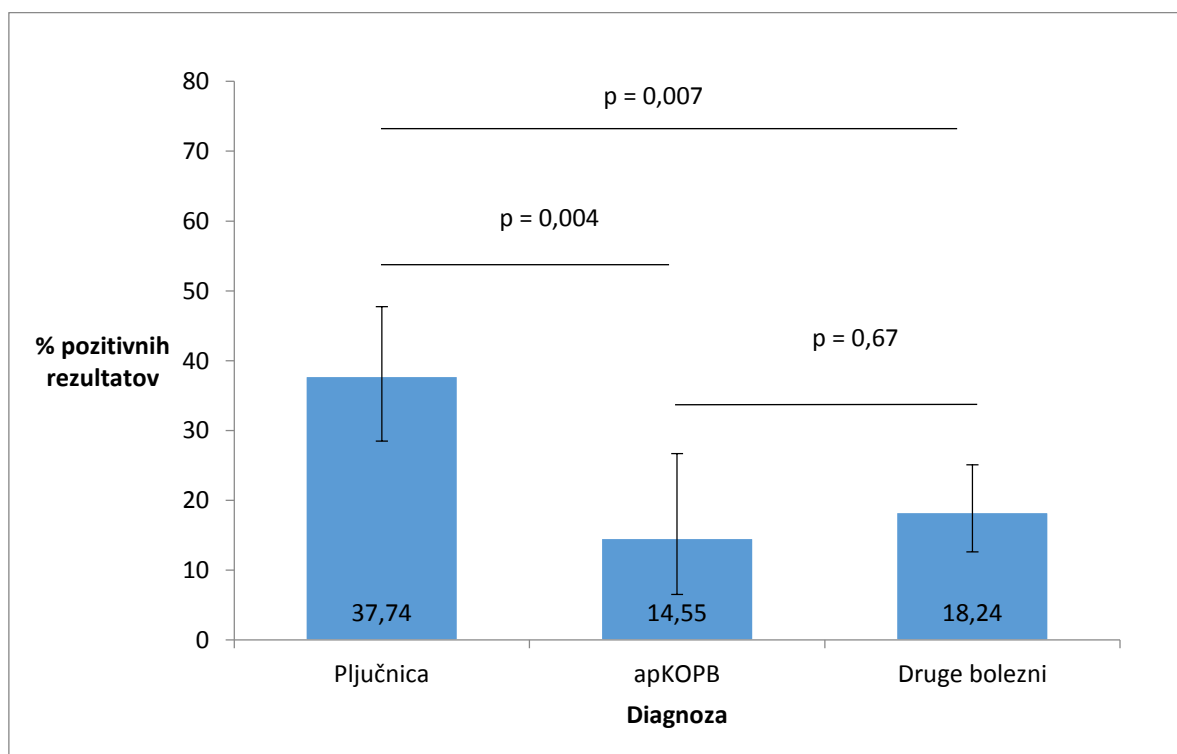
Figure 3: Comparison of positive results of different methods and from combination of methods. Columns with red borders present results, which are available in few hours.

Pri kombinaciji vseh petih metod smo 95-odstotne intervale zaupanja izračunali kot binominalne intervale zaupanja za deleže in statistično značilnost razlik med rezultati vzorcev različnih skupin bolnikov s testom Hi-kvadrat. Razlika v deležu pozitivnih vzorcev skupine bolnikov s pljučnico in bolnikov z apKOPB je statistično značilna, ravno tako razlika v deležu pozitivnih rezultatov skupine s pljučnico in skupine, hospitalizirane zaradi drugih bolezni. Toda razlika v pozitivnih rezultatih med skupinama bolnikov z apKOPB in drugimi boleznimi ni statistično značilna.

Preglednica 15: Statistično vrednotenje rezultatov kombinacije vseh metod

Table 15: Statistical evaluation of combination of all methods

Vse metode	Št. vzorcev	Št. poz. vzorcev	% poz. vzorcev	95 % CI
Pljučnica	106	40	37,74	28,5–47,7
apKOPB	55	8	14,55	6,5–26,7
Neinfektivni razlogi	159	29	18,24	12,6–25,1



Slika 4: Statistično vrednotenje rezultatov kombinacije vseh petih metod

Figure 4: Statistical evaluation of combination of all methods

4.12 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Z Bayesovim modelom računanja verjetnosti smo izračunali občutljivost in specifičnost posameznih metod glede na skupino bolnikov in 95-odstotne intervale dobljenih vrednosti.

Za računanje vrednosti z Bayesovo analizo so primerni samo vzorci, pri katerih so izvedene vse metode. Zaradi tega smo iz analize izločili vzorce, ki niso imeli rezultatov z vsako posamezno metodo (Preglednica 16).

Preglednica 16: Število in delež izločenih vzorcev za potrebe statistične analize

Table 16: Excluded samples for the purposes of the statistical analysis

Izločeni vzorci	Število izločenih vzorcev – vsi bolniki	% vseh vzorcev	Število izločenih vzorcev – pljučnica	% vseh vzorcev	Število izločenih vzorcev – apKOPB	% vseh vzorcev	Število izločenih vzorcev – druge bolezni	% vseh vzorcev
BinaxNOW	/	/	17	18,5	/	/	/	/
Kultivacija	73	23,0	30	28,6	8	14,5	43	27,4
AccuProbe	40	14,1	18	19,4	4	7,8	26	18,6
In-house hkratni PCR	20	7,6	16	17,6	2	4,1	10	8,1
In-house qPCR	76	23,8	31	29,2	8	14,5	45	28,3

4.12.1 Občutljivost

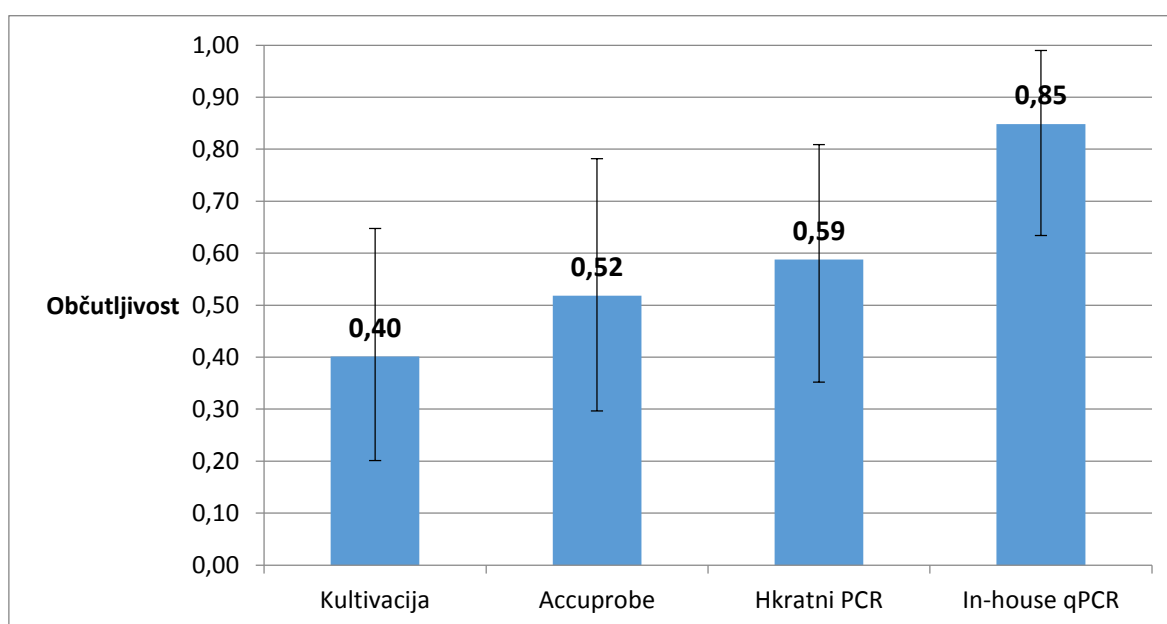
Najvišjo občutljivost za zaznavo pnevmokokov v vzorcu je imel pri vseh skupinah bolnikov in-house PCR v realnem času. Vse metode so imele najvišjo občutljivost pri vzorcih skupine bolnikov s pljučnico. Zaradi večjega števila pozitivnih vzorcev v skupini bolnikov s pljučnico je interval zaupanja izračunanih vrednosti nekoliko ožji kot pri skupinah bolnikov z apKOPB in drugimi boleznimi, kjer so izredno široki intervali zaupanja in zato izračunane vrednosti statistično manj zanesljive (Preglednica 17, slike 5–8).

Občutljivost metode BinaxNOW *S. pneumoniae* smo računali samo pri skupini bolnikov s pljučnico.

Preglednica 17: Občutljivost posamezne metode glede na skupino bolnikov

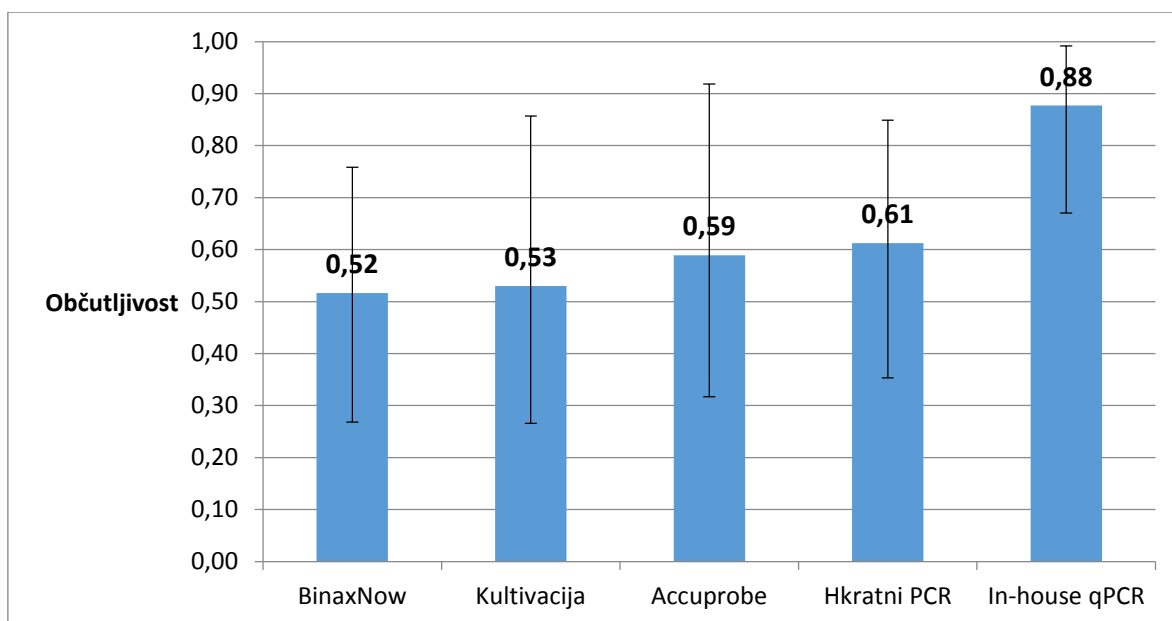
Table 17: Sensitivity of methods depending on the group of patients

Občutljivost	Vsi	95 % CI	Pljučnica	95 % CI	apKOPB	95 % CI	Druge bolezni	95 % CI
BinaxNOW	/	/	0,52	0,27–0,76	/	/	/	/
Kultivacija	0,40	0,2–0,65	0,53	0,27–0,86	0,29	0,02–0,89	0,36	0,06–0,80
AccuProbe	0,52	0,30–0,78	0,59	0,32–0,92	0,34	0,05–0,91	0,62	0,20–0,97
In-house hkratni PCR	0,59	0,35–0,81	0,61	0,35–0,85	0,60	0,12–0,98	0,36	0,06–0,83
In-house qPCR	0,85	0,63–0,99	0,88	0,67–0,99	0,63	0,15–0,99	0,65	0,21–0,98



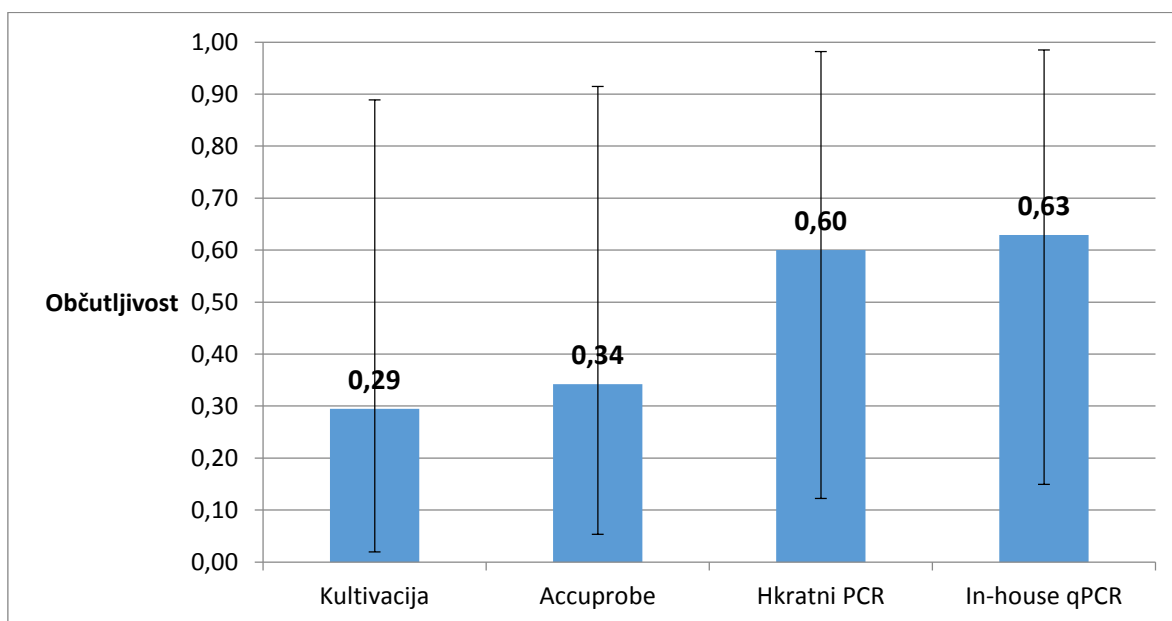
Slika 5: Občutljivost posamezne metode glede na rezultate vzorcev vseh bolnikov skupaj

Figure 5: Sensitivity of methods depending on the results from samples from all patients combined



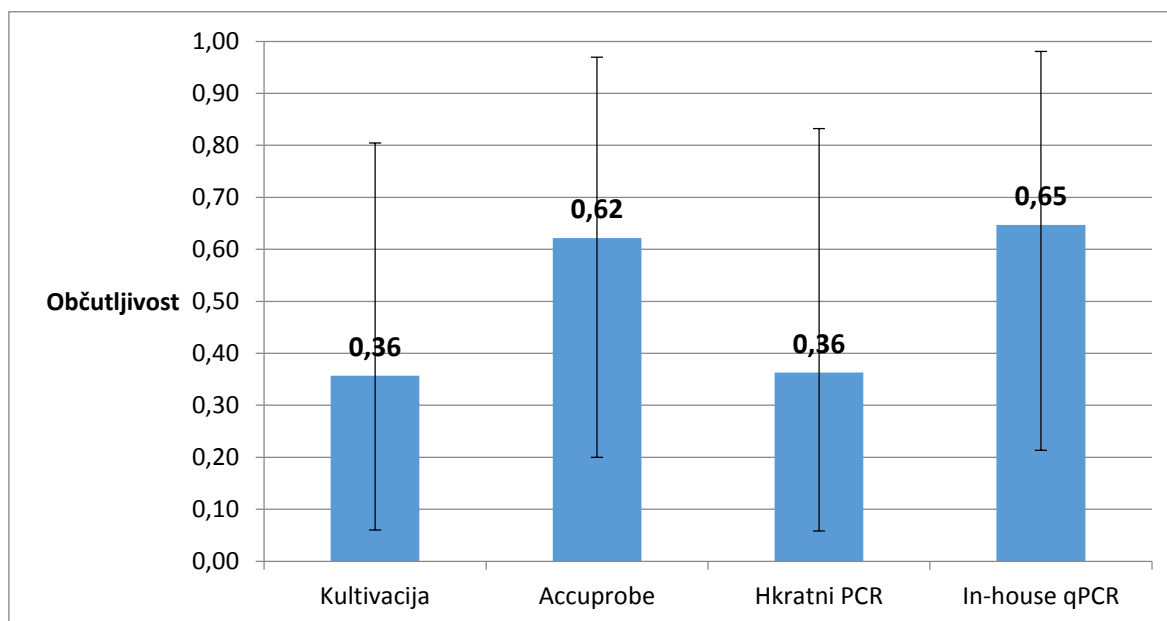
Slika 6: Občutljivost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov s pljučnico

Figure 6: Sensitivity of methods depending on the results from samples from patients with CAP



Slika 7: Občutljivost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov z apKOPB

Figure 7: Sensitivity of methods depending on the results from samples from patients with AE COPD



Slika 8: Občutljivost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih boleznih

Figure 8: Sensitivity of methods depending on the results from samples from patients hospitalized due to other reasons

4.12.2 Specifičnost

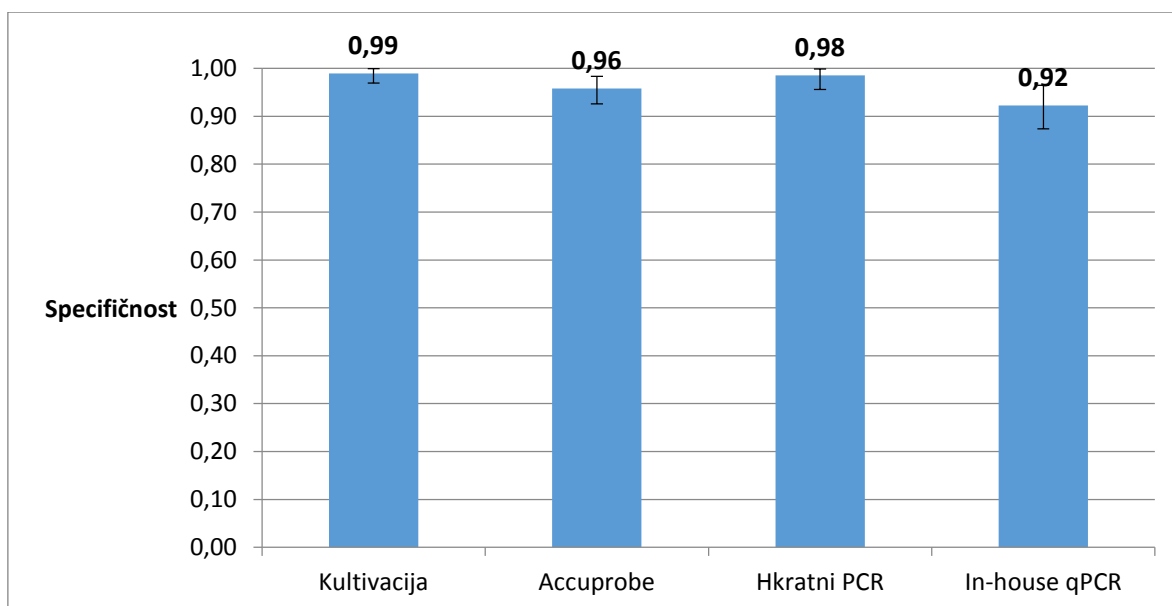
Najvišjo specifičnost za zaznavo pnevmokokov v vzorcu je imela kultivacija, najnižjo pa in-house PCR v realnem času. Zaradi velikega števila negativnih vzorcev je večina izračunanih specifičnosti nad 0,9, le pri skupini bolnikov s pljučnico imata in-house qPCR in BinaxNOW specifičnost 0,87. Pri vseh skupinah so intervali zaupanja izračunanih vrednosti ozki (Preglednica 18, slike 9–12).

Specifičnost metode BinaxNOW *S. pneumoniae* smo računali samo pri skupini bolnikov s pljučnico.

Preglednica 18: Specifičnost posamezne metode glede na skupino bolnikov

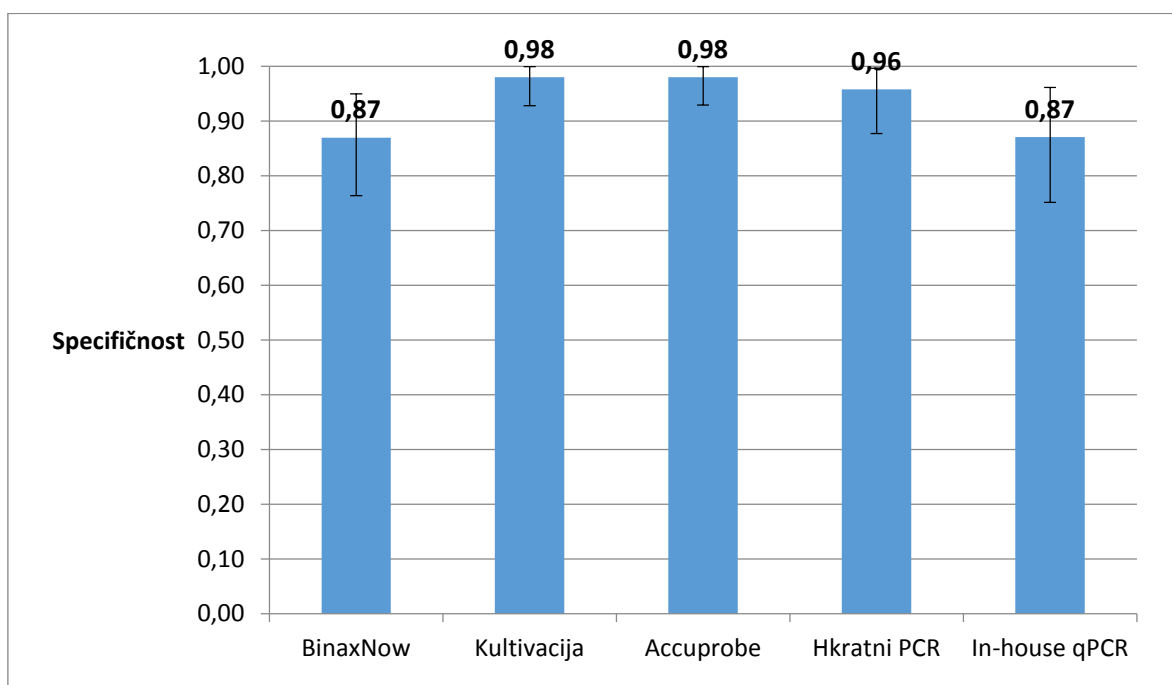
Table 18: Specificity of methods depending on the group of patients

Specifičnost	Vsi	95 % CI	Pljučnica	95 % CI	apKOPB	95 % CI	Druge bolezni	95 % CI
BinaxNOW	/	/	0,87	0,76–0,95	/	/	/	/
Kultivacija	0,99	0,97–1,00	0,98	0,93–1,00	0,98	0,93–1,00	0,98	0,94–1,00
AccuProbe	0,96	0,93–0,98	0,98	0,93–1,00	0,94	0,86–0,99	0,94	0,88–0,99
In-house hkratni PCR	0,98	0,96–1,00	0,96	0,88–1,00	0,95	0,85–1,00	0,99	0,96–1,00
In-house qPCR	0,92	0,87–0,96	0,87	0,75–0,96	0,93	0,83–0,99	0,93	0,87–0,98



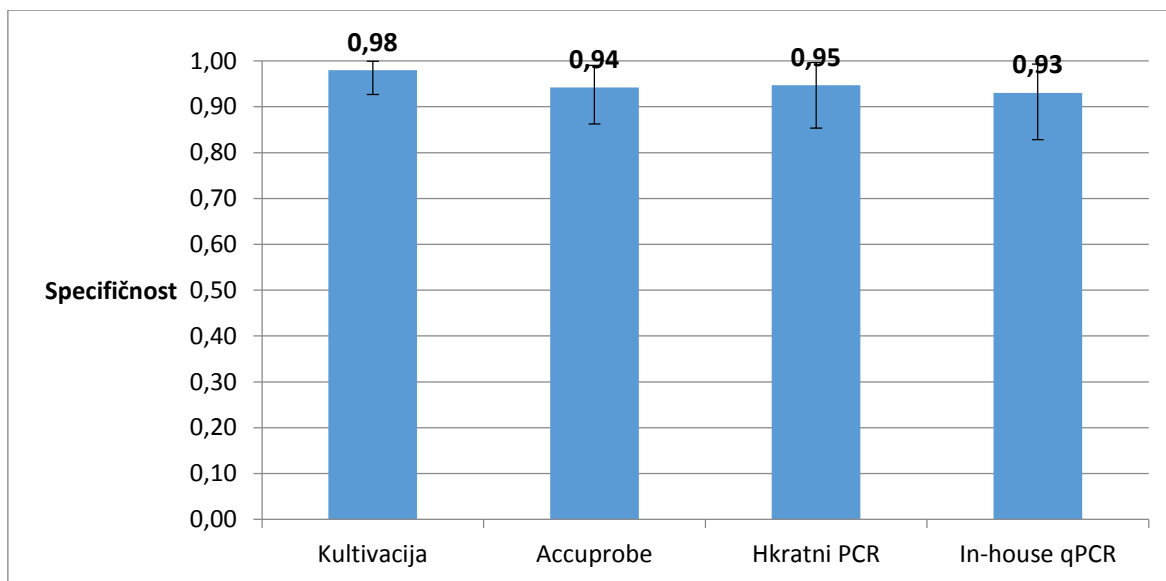
Slika 9: Specifičnost posamezne metode glede na rezultate vzorcev vseh bolnikov skupaj

Figure 9: Specificity of methods depending on the results from samples from all patients combined



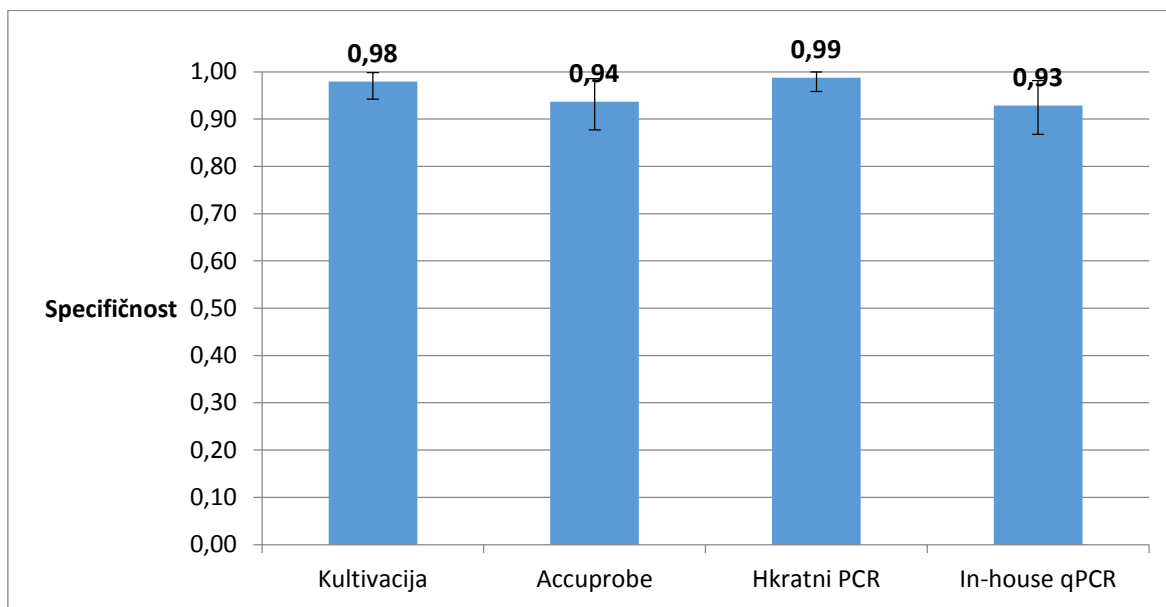
Slika 10: Specifičnost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov s pljučnico

Figure 10: Specificity of methods depending on the results from samples from patients with CAP



Slika 11: Specifičnost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov z apKOPB

Figure 11: Specificity of methods depending on the results from samples from patients with AE COPD



Slika 12: Specifičnost posamezne metode glede na rezultate vzorcev bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni

Figure 12: Specificity of methods depending on the results from samples from patients hospitalized due to other reasons

5 RAZPRAVA

S. pneumoniae je najpogostejši vzrok bakterijskih pljučnic, saj povzroča do dve tretjini vseh primerov zunajbolnišničnih pljučnic, zdravljenih v bolnišnicah (Catterall, 1999). Postavitev diagnoze pnevmokokne pljučnice z uporabo klasičnih mikrobioloških tehnik je zahtevna, saj metoda izolacije bakterije iz krvi ni dovolj občutljiva, kultivacija iz izmečka lahko predstavlja kolonizacijo, invazivne metode odvzema vzorcev pa se izvajajo le redko (Murdoch in sod., 2003). Izjemno težko morfološko ločevanje bakterije *S. pneumoniae* od drugih zelenečih streptokokov je verjeten vzrok nizke občutljivosti klasičnih mikrobioloških tehnik za odkrivanje bakterije *S. pneumoniae* (Mustafa in sod., 2001). Natančna etiološka diagnoza je pomembna predvsem zaradi ustreznega antibiotičnega zdravljenja.

Kolonizacija zdravih posameznikov z bakterijo *S. pneumoniae* predstavlja težavo pri vrednotenju visoko občutljivih metod za zaznavanje okužb s pnevmokoki. Bakterija kolonizira zgornja dihalna od 5 do 70 % zdravih odraslih in od 9 do 43 % zdravih otrok (Saravolatz in sod., 2007; Kadioglu in sod., 2002). Podatki se zelo razlikujejo glede na starost in življenjsko okolje posameznikov in tudi glede na metodo, ki so jo uporabili v posamezni raziskavi (Saravolatz in sod., 2007; Kadioglu in sod., 2002). Podatki o pogostosti kolonizacije z bakterijo *S. pneumoniae* pri bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo v stabilni fazi so zelo redki (Patel in sod., 2002). Večina pnevmokokov je dobro občutljiva za penicilin in tudi odporni sevi večinoma kažejo le zmerno odpornost proti penicilinu (Catterall, 1999). Občutljivi in specifični testi, ki jih v kliničnem laboratoriju lahko hitro izvedemo, so nujni za zgodnjo diagnozo in učinkovito ciljno antibiotično zdravljenje.

Za ugotavljanje deleža odrasle populacije, ki je koloniziran z bakterijo *S. pneumoniae*, in za poskus ločevanja med kolonizacijo in okužbo z bakterijo *S. pneumoniae* smo uporabili kombinacijo podatkov, pridobljenih z različnimi mikrobiološkimi metodami, in klinične podatke, pridobljene med bolnišnično obravnavo bolnika z interpretacijo zdravnika, ki je skrbel za posameznega bolnika.

Diagnosticiranje pnevmokokne zunajbolnišnične pljučnice je zahtevno tudi zato, ker ni zlatega standarda. Idealni zlati standard ima stodontno specifičnost in stodontno občutljivost, kar pomeni, da nima lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Primer so hemokulture, ki jih štejemo za stodontno specifične, vendar so zelo slabo občutljive, zato z njimi ne moremo identificirati vseh bolnikov s pnevmokokno zunajbolnišnično pljučnico. Ocenjevanje občutljivosti in specifičnosti ni zahtevno, če poznamo pravi vzrok bolnikove bolezni. Ob odsotnosti zlatega standarda občutljivosti in specifičnosti testa ne moremo izračunati neposredno in moramo uporabiti naprednejše metode (Snellman, 2008).

V raziskavi smo uporabili Bayesov model računanja verjetnosti, ki omogoča računanje občutljivosti in specifičnosti brez zlatega standarda (Keith in sod., 2012).

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, kolikšen del odrasle populacije je koloniziran z bakterijo *S. pneumoniae* in če je delež bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo, ki so kolonizirani z bakterijo *S. pneumoniae*, višji kot pri ostalih skupinah odraslih. Želeli smo tudi z ustrežno kombinacijo testov povečati število pravilno dokazanih pnevmokoknih okužb dihal in omogočiti ciljano antibiotično zdravljenje s penicilinom.

5.1 BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae*

S komercialnim testom BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* (Alere BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card, Alere, ZDA) smo testirali 285 vzorcev urina. Skupno smo dobili 22 pozitivnih rezultatov. Pri bolnikih z apKOPB nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata, pri bolnikih s pljučnico je bilo osemnajst (19,6 %) vzorcev urina pozitivnih in pri skupini bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, so bili štirje (2,7 %) vzorci pozitivni. Od štirih bolnikov s pozitivnimi hemokulturami so bili vzorci urina treh bolnikov pozitivni s testom BinaxNOW.

V objavljeni literaturi poročajo o visoki občutljivosti in specifičnosti testa BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae*. Take rezultate so dobili Smith in sodelavci (2003), ki so vrednotili test BinaxNOW na 107 vzorcih urina bolnikov s pnevmokokno okužbo in 106 vzorcih urina kontrol brez pnevmokokne okužbe. Pnevkokno okužbo so potrdili s pozitivnimi hemokulturami. V raziskavi so ugotovili 97-odstotno specifičnost in 82-odstotno občutljivost testa BinaxNOW *S. pneumonaie*. Podobno sta test BinaxNOW vrednotila Diederer in Peeters (2007) na 58 vzorcih urina bolnikov s pnevmokokno okužbo in 136 vzorcih urina oseb brez pnevmokokne okužbe. Tudi tu so pnevmokokno okužbo potrdili s pozitivnimi hemokulturami ali s kultivacijo izmečka. V raziskavi so ugotovili 98-odstotno specifičnost in 69-odstotno občutljivost testa BinaxNOW *S. pneumonaie*. Dominguez in sodelavci (2001) poročajo, da je test BinaxNOW dobro orodje za diagnosticiranje pnevmokokne pljučnice, še zlasti pri bolnikih brez bakteriemije. Testirali so vzorce urina 51 bolnikov z dokazano pnevmokokno pljučnico, toda poleg vzorcev urina bolnikov z bakteriemijo so odvzeli tudi vzorce urina bolnikov s pnevmokokno pljučnico brez bakteriemije. Test je bil pozitiven pri 41 (80,4 %) bolnikih; od 28 bakteriemičnih bolnikov je bil pozitiven pri 23 (82,1 %) bolnikih in od 23 bolnikov brez bakteriemije je bil test pozitiven pri osemnajstih (78,3 %) bolnikih. Briones in sodelavci (2006) so tudi ugotovili 81-odstotno občutljivost in 80-odstotno specifičnost pri bolnikih s pljučnico in 99-odstotno specifičnost pri bolnikih brez okužbe.

Najdemo tudi več metaanaliz, kjer so ugotavljali občutljivost in specifičnost testa BinaxNOW. Horita in sodelavci (2013) so izvedli metaanalizo desetih člankov in

izračunali skupno občutljivost in specifičnost testa BinaxNOW *S. pneumoniae*. Izračunana skupna občutljivost je bila 75 %. Izračunali so tudi dve specifičnosti. Prva je bila 95 % in je vključevala bolnike z znanimi nepnevmokoknimi vzroki pljučnice. Druga je bila 80 % in je poleg bolnikov z znanimi vzroki pljučnice vključevala tudi take z neznanimi vzroki. Podobno so Boulware in sodelavci (2007) svoje rezultate primerjali z rezultati metaanalize, v katero so vključili 25 raziskav o učinkovitosti testa BinaxNOW. V svoji raziskavi so testirali 70 vzorcev urina bolnikov s pnevmokokno pljučnico, od katerih jih je bilo 47 okuženih tudi z virusom HIV. Ugotovili so 81-odstotno občutljivost in 98-odstotno specifičnost testa BinaxNOW; okužba z virusom HIV ni vplivala na rezultate. Rezultati metaanalize so kazali 74-odstotno občutljivost in 94-odstotno specifičnost testa BinaxNOW, ko so rezultate testa vrednotili glede na rezultate klasičnih mikrobioloških metod za odkrivanje *S. pneumoniae*.

Vsi raziskovalci poročajo o občutljivosti testa nad 75 % in o še višji specifičnosti. V naši raziskavi smo z Bayesovim modelom računanja verjetnosti, ki za izračun občutljivosti in specifičnosti ne potrebuje zlatega standarda, izračunali 52-odstotno občutljivost in 87-odstotno specifičnost testa pri bolnikih s pljučnico. Osemnajst (19,6 %) pozitivnih vzorcev urina pri bolnikih z zunajbolnišnično pljučnico in le štirje pozitivni rezultati pri drugih dveh skupinah bolnikov kažejo na to, da metoda pravilno prepozna pravo pnevmokokno okužbo. Štirje (2,7 %) pozitivni rezultati vzorcev urina pri skupini bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, bi lahko bili posledica nedavno prebolele pnevmokokne pljučnice (Marcos in sod., 2003; Briones in sod., 2006) ali posledica nedavnega pnevmokoknega cepljenja (Navarro in sod., 2004). Marcos in sodelavci (2003) so testirali 398 vzorcev urina bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico. Pri 68 bolnikih z dokazano pnevmokokno pljučnico je BinaxNOW dal pozitiven rezultat pri vseh vzorcih. Glede na ostale podatke so izračunali specifičnost testa, ki je bila 82 %. Ugotovili so tudi, da ostane test pozitiven tudi še nekaj tednov po preboleli pnevmokokni pljučnici.

Edine raziskave, ki govorijo o vplivu kolonizacije s pnevmokoki, so bile narejene na vzorcih urina otrok. To so ugotavljali Navarro in sodelavci (2004), ki so testirali test BinaxNOW *S. pneumoniae* na vzorcih urina otrok brez akutne okužbe s pnevmokoki. Brise nosnega dela žrela so vzeli 103 otrokom in s kultivacijo ugotovili petnajst (14,5 %) asimptomatskih nosilcev bakterije *S. pneumoniae*. Pri asimptomatskih nosilcih so dobili deset (66,6 %) pozitivnih rezultatov testa BinaxNOW in pri otrocih brez kolonizacije s pnevmokoki 29 (32,9 %) pozitivnih rezultatov. Zaključili so, da test BinaxNOW verjetno ni uporaben za razlikovanje med otroki s pnevmokokno pljučnico in tistimi brez nje. Predvidevajo še, da na rezultate vpliva tudi predhodno cepljenje s pnevmokoknim cepivom. Hamer in sodelavci (2002) so testirali vzorce urina 210 zdravih otrok, starih od dveh do šestdeset mesecev. Vsem so vzeli tudi brise nosnega dela žrela in izvedli kultivacijo. Dobili so 33 pozitivnih testov urinskega antigena in le trije otroci s pozitivnim testom urina niso bili nosilci *S. pneumoniae*. Ugotovili so, da je veliko večja verjetnost, da

imajo nosilci *S. pneumoniae* lažno pozitiven test BinaxNOW kot otroci, ki niso nosilci. Ugotovili so še, da delež nosilcev pada s starostjo. Tako kažejo tudi rezultati raziskave Dowella in sodelavcev (2001). Ugotovili so, da ni pri otrocih z dokazano pljučnico nič bolj kot pri zdravih otrocih verjetno, da bo test BinaxNOW pozitiven. Najverjetneje je, da bo test pozitiven pri otrocih, ki so kolonizirani z bakterijo *S. pneumoniae*.

V naši raziskavi nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata pri testih urina pri skupini bolnikov z apKOPB, podobno kot v objavljeni literaturi. Murdoch in sodelavci (2003) so s testom BinaxNOW testirali 97 vzorcev urina bolnikov s KOPB, ki niso imeli znakov pljučnice. Pozitiven rezultat so dobili pri le treh bolnikih, vsi so imeli apKOPB. Pri štirih bolnikih so s kultivacijo dokazali pnevmokoke, toda le pri enem so dobili tudi pozitiven antigen. Andreo in sodelavci (2010) so uporabili test BinaxNOW za ugotavljanje pnevmokoknih poslabšanj KOPB. Primerjali so rezultate testa pri bolnikih z apKOPB (17,6 %) in bolnikih s stabilno KOPB (10,3 %). S koncentriranjem urina so dobili bistveno višje rezultate tako pri bolnikih z apKOPB (41,4 %) kot pri tistih s stabilno KOPB (76,5 %). Antigen je bil pozitiven pri 17,6 % bolnikov, pri katerih so izolirali *S. pneumoniae* iz izmečka, in le pri enem (3 %), kjer pa niso odkrili pnevmokokov v kulturi.

Briones in sodelavci (2006) so ugotovili prisotnost pnevmokoknega antigena v urinu pri 7,7 % (t.j. pri dvanajstih od 155) bolnikov z apKOPB, kar so razlagali kot posledico nedavne okužbe ali morebitne pnevmokokne kolonizacije.

Glede na rezultate testa BinaxNOW *S. pneumoniae*, izvedenega na vzorcih urina v naši raziskavi, lahko sklepamo, da test zazna pravo pnevmokokno okužbo, le redko pa pnevmokokno kolonizacijo, saj smo osemnajst pozitivnih rezultatov dobili pri skupini bolnikov s pljučnico in le štiri pozitivne rezultate pri drugih dveh skupinah bolnikov. Število lažno pozitivnih rezultatov zaradi potencialne pnevmokokne kolonizacije pri bolnikih brez pljučnice je bilo majhno; le štirje pozitivni vzorci urina od 193 (2,07 %). Pri bolnikih s pljučnico, ki imajo iz respiratornih kužnih identificiran pnevmokok, urinski antigen pa je negativen, lahko sklepamo, da pnevmokok morda ni povzročitelj pljučnice in da je identifikacija pnevmokoka posledica pnevmokokne kolonizacije. V takih primerih bi morda morali ob neoptimalnem odzivu na antibiotik zelo hitro ukrepati s spremenjeno antibiotično terapijo. To hipotezo bi bilo treba preveriti v nadaljnjih prospektivnih raziskavah.

Z Bayesovim modelom računanja verjetnosti smo ugotovili visoko specifičnost testa BinaxNOW *S. pneumoniae* (87-odstotno) in nižjo občutljivost (52-odstotno) pri vzorcih bolnikov s pljučnico. Zaradi dokaj nizkega števila pozitivnih rezultatov je 95-odstotni interval zaupanja širok (27–76 %). Pri ostalih dveh skupinah bolnikov občutljivosti in specifičnosti tega testa nismo računali, saj test ne zaznava pnevmokokne kolonizacije, zato smo tudi mi pri teh dveh skupinah bolnikov dobili le štiri pozitivne rezultate. Nižja

občutljivost je posledica tega, da ostale metode zaznajo tudi kolonizacijo s pnevmokoki, zato z njimi dobimo veliko več pozitivnih rezultatov. Pri vzorcih bolnikov, koloniziranih s pnevmokoki, ki so bili pozitivni z ostalimi metodami, smo s testom BinaxNOW dobili negativen rezultat, kar se izraža na izračunani občutljivosti.

Pri vzorcih bolnikov s pnevmokokno pljučnico, potrjeno s pozitivnimi hemokulturami, se je urinski test BinaxNOW izkazal ravno tako dobro kot PCR v realnem času. Od vzorcev štirih bolnikov z bakteriemično pnevmokokno pljučnico sta obe metodi imeli tri pozitivne rezultate, kar je precej boljše kot pri ostalih metodah. Test BinaxNOW ima nižjo občutljivost kot PCR v realnem času, toda bolje razlikuje med okužbo in kolonizacijo. Obenem je zelo enostaven, rezultati pa so na voljo v petnajstih minutah po sprejemu kužnine.

5.2 KULTIVACIJA RESPIRATORNIH KUŽNIN

Kultivacijo smo izvedli pri 317 respiratornih kužninah. Bakterijo *S. pneumoniae* smo osamili v dvajsetih primerih. Pri vzorcih bolnikov z apKOPB nam je pnevmokoke uspelo izolirati v enem primeru (1,8 %), pri vzorcih bolnikov s pljučnico so nam porasli pnevmokoki na enajstih gojiščih (10,5 %) in pri vzorcih bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, smo dobili osem pozitivnih rezultatov (5,1 %). Glede na klinične podatke smo pozitivne rezultate pri bolnikih z apKOPB in pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, šteli kot posledico pnevmokokne kolonizacije.

Kultivacija respiratornih kužnih velja za zlati standard za mikrobiološko dokazovanje povzročitelja bolezni. Toda osamitev bakterije *S. pneumoniae* je dokaj zahtevna, saj moramo upoštevati več dejavnikov. Pnevmonoke morfološko težko ločimo od ostalih zelenečih streptokokov (Arbique in sod., 2004). Poleg tega ima nedavno odkrita vrsta streptokoka, *S. pseudopneumoniae*, podobne fenotipske lastnosti kot *S. pneumoniae*, zato je potrebna kombinacija fenotipskih in genotipskih testov za identifikacijo te vrste (Arbique in sod., 2004). Zanimive lastnosti sevov *S. pseudopneumoniae* so, da so odporni proti optohinu, kadar so inkubirani v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂, in občutljivi za optohin, kadar so inkubirani v okoljski atmosferi; niso topni v žolču in so pozitivni s testom AccuProbe *S. pneumoniae*. Ravno tako tudi genetski testi za zaznavanje genov *ply* in *sodA* ne ločijo med novo vrsto in *S. pneumoniae* (Arbique in sod., 2004). V drugi raziskavi (Keith in sod., 2006) so ugotovili še, da so sevi *S. pseudopneumoniae* brez pnevmokokne kapsule, da so med inkubacijo v CO₂ odporni proti optohinu, toda občutljivi za optohin med inkubacijo v okoljskem zraku. Vzorci urina bolnikov, okuženih z bakterijo *S. pseudopneumoniae*, so pozitivni s testom BinaxNOW *S. pneumoniae*. V raziskavi Keitha in sodelavcev (2006) so bili sevi *S. pseudopneumoniae* občutljivi za penicilin, toda 60 % jih je bilo odpornih proti eritromicinu in 77 % proti tetraciklinu. Vsi bolniki so imeli simptome okužbe spodnjih dihal in 79 % jih je imelo KOPB. Statistično so dokazali, da

imajo bolniki z okužbo s *S. pseudopneumoniae* verjetneje KOPB kot tisti bolniki, pri katerih so izolirali *S. pneumoniae*.

Za osamitev bakterije *S. pneumoniae* je pomembno, da je vzorec odvzet pred antibiotično terapijo. Korsgaard in sodelavci (2005) so raziskovali vpliv antibiotične terapije na uspešno določitev bakterije *S. pneumoniae* kot povzročitelja okužbe spodnjih dihal. Ugotovili so, da moramo vzorce obvezno odvzeti še pred začetkom antibiotične terapije. S kultivacijo so dobili negativne rezultate, če so respiratorne vzorce vzeli po začetku terapije. Tudi urinski antigen je dal lažno negativen rezultat, če je bolnik prejemal antibiotike več kot dva dni (dva do štiri tedne prej) pred oddajo urina za testiranje (Korsgaard in sod., 2005).

Za kultivacijo je pomembno, da je vzorec ustrezne kakovosti (Lentino in Lucks, 1987). Sondag in sodelavci (1977) so testirali gojišča z ovčjo krvjo in dodatkom gentamicina. Ugotovili so, da bolj kot dodatek gentamicina odkrivanje pnevmokokov izboljša navaden mikroskopski pregled izmečka in ugotavljanje njegove ustreznosti glede na število levkocitov, česar takrat še niso rutinsko izvajali.

Zaradi zahtevne kultivacije in osamitve bakterije *S. pneumoniae* obstaja precej raziskav, kjer so vrednotili učinkovitost kultivacije in poskušali uvesti določene izboljšave. Dilworth in sodelavci (1975) so z dodatkom gentamicina krvnemu gojišču izboljšali zaznavanje pnevmokokov za 35 % (s 54 na 89 %). Nasprotno so Wu in sodelavci (1980) ugotovili, da dodatek gentamicina ob aerobni inkubaciji gojišč bistveno ne izboljša zaznavanja pnevmokokov. Večji uspeh pri osamitvi pnevmokokov so odkrili, ko so gojišča inkubirali anaerobno. V takih pogojih so pnevmokokne kolonije lažje ločevali od drugih kolonij bakterijske običajne mešane flore. Zanimive zaključke o kultivaciji respiratornih kužnin sta zapisala Lentino in Lucks (1987), ki sta vrednotila kultivacijo izmečkov in njeno uporabnost pri diagnosticiranju pljučnic. Makroskopsko gnojnost in mikroskopsko vrednotenje vzorcev sta primerjala z diagnozo bolnikov. Ugotovila sta, da sta ta dva kriterija nezadostna. Podobno sta ugotovila tudi za gramski razmaz in kultivacijo izmečkov, saj sta bili obe metodi sami po sebi preveč neobčutljivi in nespecifični. Zato priporočata, da se pri postavljanju diagnoze upošteva tudi druge bolnikove podatke.

Poglavitna težava kultivacije pri odkrivanju povzročitelja pljučnice je, da s kultivacijo ne ločimo med pravo okužbo in kolonizacijo (Drummond in sod., 2000). Drummond in sodelavci (2000) so preučevali etiologijo pljučnic pri otrocih (0–16 let, 51 % jih je bilo mlajših od dveh let). Vsem otrokom s pljučnico, t.j. 136 otrokom, so vzeli kri in različne respiratorne vzorce ter izvedli cel spekter preiskav (kultivacija, serologija, PCR, CRP). V 37 % je pljučnico povzročil virus, bakterije so povzročile pljučnico le v štirinajstih odstotkih. Najpogostejši bakterijski povzročitelj je bil *S. pyogenes* (7 %). *S. pneumoniae* je bil povzročitelj pljučnice v štirih odstotkih (pet primerov). *S. pneumoniae* so sicer izolirali

v 23 primerih, toda predvidevajo, da je bil pri večini (t.j. pri osemnajstih od 23) verjetno prisoten zaradi asimptomatskega nosilstva.

To lahko predstavlja težavo tudi pri naših rezultatih kultivacije respiratornih vzorcev bolnikov, ki so bili diagnosticirani z zunajbolnišnično pljučnico. Kljub temu je naš delež pnevmokoknih izolatov pri bolnikih z zunajbolnišnično pljučnico približno tak kot v literaturi. Določene raziskave (Drummond in sod., 2000) poročajo o nižjem odstotku pnevmokokov kot povzročiteljev pljučnic, druge pa o višjem. Tako so na primer Luna in sodelavci (2000) v raziskavi preučevali etiologijo pljučnic pri 343 bolnikih in odkrili 167 mikroorganizmov pri 144 bolnikih. Najpogosteje so izolirali *S. pneumoniae*, odkrili so ga v 35 primerih (24 %).

Osem (5,1 %) pozitivnih rezultatov kultivacije pri skupini bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, kaže na kolonizacijo. En sam pozitiven rezultat (1,8 %) smo dobili pri skupini bolnikov z apKOPB. To je nekoliko nižji delež pozitivnih rezultatov, kot jih zasledimo v literaturi. Nekoliko višje deleže so poročali Rosell in sodelavci (2005), ki so kultivirali vzorce spodnjih dihal treh skupin udeležencev (zdravi, stabilna KOPB in poslabšanje KOPB). Potencialno patogene mikroorganizme so našli pri štirih odstotkih zdravih posameznikov, pri 29 % posameznikov s stabilno KOPB in pri 54 % bolnikov z apKOPB. Poglavitna patogena pri skupini z apKOPB sta bila *H. influenzae* (30 %) in *P. aeruginosa* (9 %). *S. pneumoniae* so odkrili pri devetih odstotkih bolnikov s stabilno KOPB in pri sedmih odstotkih bolnikov s poslabšanjem KOPB. Pri zdravih posameznikih pnevmokokov niso odkrili. Še višje deleže so objavili Banerjee in sodelavci (2004), ki so preučevali vpliv potencialno patogenih mikroorganizmov v izmečku na vnetje spodnjih dihal, stopnjo plazemskega fibrinogena in splošni zdravstveni status posameznikov s stabilno KOPB. Od 67 udeležencev raziskave jih je 40 % imelo možne patogene v izmečku, od tega jih je imelo devet (13,4 %) *S. pneumoniae*. Pri posameznikih s potencialno patogenimi bakterijami so ugotovili močnejši vnetni odziv, slabši splošni zdravstveni status kot tudi povečano stopnjo fibrinogena v plazmi. Podobne rezultate so dobili Zalacain in sodelavci (1999) ob preučevanju dejavnikov, ki vplivajo na bakterijsko kolonizacijo pri KOPB. 88 bolnikov s stabilno KOPB so bronhoskopirali in kultivirali njihove izpirke. Bakterijsko rast so odkrili pri 40,9 % bolnikov, od tega so pri 15,5 % bolnikov odkrili *S. pneumoniae*. Pri zdravih kontrolah niso odkrili bakterijske rasti. Zaključili so, da imajo bolniki s stabilno KOPB pogosto bakterijsko kolonizacijo distalnih dihalnih poti, za katero so krivi kajenje in zamašene dihalne poti.

Ravno tako so Miravittles in sodelavci (1999) preučevali okvare dihal pri 91 bolnikih s poslabšani KOPB v povezavi z bakterijami v izmečku. Ugotovili so, da sta pri najbolj prizadetih bolnikih pogostejši bakteriji *H. influenzae* in *P. aeruginosa*. *S. pneumoniae* so izolirali pri desetih odstotkih bolnikov s poslabšani KOPB.

Z Bayesovim modelom računanja verjetnosti smo izračunali specifičnost in občutljivost kultivacije respiratornih kužnin. Ugotovili smo visoko specifičnost kultivacije (99 %) in nizko občutljivost (40 %). Visoka specifičnost testa je bila pričakovana, saj zaradi identifikacijskih testov (zavrta rast pnevmokoknega seva okoli optohinskega diska in test lateksne aglutinacije) in morfoloških značilnosti dela pnevmokoknih sevov (sluzne kolonije, ki so posledica bakterijske kapsule) streptokokni sev le težko lažno proglasimo za *S. pneumoniae*. Toda kultivacija respiratornih kužnin za odkrivanje pnevmokokov ima izredno nizko občutljivost; od vseh metod, uporabljenih v tej raziskavi, najnižjo. Nizka občutljivost je bila pričakovana, saj je morfološko pnevmokoke od ostalih zelenečih streptokokov izredno težko razlikovati in zato lahko dobimo lažno negativne rezultate. Toda ravno to razlikovanje je osnova uspešne izolacije *S. pneumoniae* iz kultiviranih respiratornih kužnin. Negativni rezultati so lahko tudi posledica odvzema vzorca po začetku antibiotične terapije. Tudi v literaturi je omenjena nizka občutljivost kultivacije, npr. Lentino in Lucks (1987).

5.3 HEMOKULTURE

Pozitivne hemokulture veljajo za zlati standard za dokončno mikrobiološko določanje povzročitelja pljučnice. V naši raziskavi so bile hemokulture odvzete 54 bolnikom s pljučnico in pri tej skupini bolnikov smo izolirali štiri (7,4 %) izolate *S. pneumoniae*. To je dokaj nizek odstotek, vendar tudi v literaturi najdemo podobne rezultate. Tako so Chalasani in sodelavci (1995) ugotavljali klinično uporabnost hemokultur pri bolnikih s pljučnico. Od 517 bolnikov s pljučnico so dobili pozitivne hemokulture le pri 34 (6,6 %) bolnikih. Pri devetnajstih (3,7 %) so izolirali *S. pneumoniae*. Glede na precej nizek delež pozitivnih hemokultur raziskovalci zaključujejo, da ima preiskava še zlasti glede na ceno verjetno omejeno klinično uporabnost. Podobne rezultate pozitivnih hemokultur pri bolnikih s pljučnico so dobili tudi Cvitkovic Spik in sodelavci (2013). Od 340 odvzetih hemokultur so *S. pneumoniae* izolirali le iz sedemnajstih (5,0 %) pozitivnih hemokultur. Toda drugačen rezultat so dobili, ko so na vzorcih plazme ali hemokultur izvedli qPCR, specifičen za *S. pneumoniae*. Pozitiven rezultat so dobili pri 96 (28,2 %) bolnikih. Pri vseh 340 bolnikih s pljučnico so odvzeli tudi vzorec zgornjih dihal (bris nosnega dela žrela ali aspirat sapnika). Pri bolnikih s pljučnico, kjer so zaznali pnevmokoke v vzorcih krvi, so zanesljivo potrdili pnevmokokno pljučnico. Pri bolnikih, kjer so pnevmokoke zaznali samo v respiratornih vzorcih in ne v krvi, so potrdili le možnost pnevmokokne pljučnice.

5.4 IDENTIFIKACIJSKI TEST ACCUPROBE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

S testom AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* Culture Identification smo dobili 284 rezultatov, od tega 25 pozitivnih. Pri skupini bolnikov z apKOPB smo dobili dva pozitivna rezultata (3,9 %), pri bolnikih s pljučnico smo dobili enajst pozitivnih rezultatov (11,8 %) in pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, smo dobili dvanajst pozitivnih

rezultatov (8,6 %). Glede na klinične podatke smo pozitivne rezultate pri bolnikih z apKOPB in pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, šteli kot posledico pnevmokokne kolonizacije.

V literaturi najdemo podatek, da ima test odlično občutljivost in specifičnost. Denys in Carey (1992) sta vrednotila test AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* Culture Identification. Uporabila sta 172 izolatov *S. pneumoniae* in 204 druge bakterijske seve. Pnevmonokne seve sta identificirala s klasičnimi metodami (morfologija, občutljivost za optohin, lateksna občutljivost, topnost žolčnih soli). Ugotovila sta stodontno občutljivost in specifičnost testa AccuProbe. Drugje v literaturi (Arbique in sod., 2004; Keith in sod., 2006) najdemo nekoliko slabšo specifičnost zaradi lažno pozitivnih rezultatov pri testiranju *S. pseudopneumoniae*.

Glede na literaturo smo sklepali, da bomo dobili več pozitivnih rezultatov kot s kultivacijo, saj smo testirali poraslo kulturo na gojiščih, kamor smo zasadili respiratorne kužnine. Predvidevali smo, da bomo dobili pozitiven rezultat tudi v primeru, če nam posamezne pnevmokokne kolonije ne bo uspelo osamiti iz množice alfaemolitičnih kolonij zelenečih streptokokov. Res smo dobili nekoliko več pozitivnih rezultatov (25 s testom AccuProbe in dvajset s kultivacijo), toda le trinajst (65 %) vzorcev, pri katerih smo osamili pnevmokoke s kultivacijo, je bilo pozitivnih tudi s testom AccuProbe. Od sedmih vzorcev, pozitivnih s kultivacijo in brez pozitivnega rezultata testa AccuProbe, so bili štirje resnično negativni s testom AccuProbe in pri treh test AccuProbe ni bil izveden. Če treh vzorcev, kjer test AccuProbe ni bil izveden, ne upoštevamo, dobimo ujemanje pozitivnih rezultatov kultivacije s testom AccuProbe v 76,5 %.

Dvanajst pozitivnih rezultatov testa AccuProbe pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, lahko pripišemo asimptomatski kolonizaciji. Od teh je kar sedem vzorcev takih, kjer nismo dobili pozitivnega rezultata z nobeno drugo metodo. Zanimiva je tudi majhna razlika med deležem pozitivnih rezultatov testa AccuProbe pri vzorcih bolnikov s pljučnico in pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni (11,8 % proti 8,6 %).

Z Bayesovim modelom računanja verjetnosti smo izračunali specifičnost in občutljivost testa AccuProbe *S. pneumoniae*. Ugotovili smo visoko specifičnost testa (96 %) in nižjo občutljivost (52 %). Visoko specifičnost testa smo pričakovali, omenjena je tudi v literaturi npr. Denys in Carey (1992). Toda tako kot več pozitivnih rezultatov smo pričakovali tudi precej višjo občutljivost, kot jo ima kultivacija respiratornih kužnin. Razlika v občutljivosti med kultivacijo in testom AccuProbe *S. pneumoniae* sicer je, toda le dvanajst odstotnih točk. Občutljivost, ki smo jo izračunali z Bayesovim modelom računanja verjetnosti, je bistveno nižja kot tista, omenjena v literaturi. Kot predvidevamo, je posledica tega, da smo mi test izvedli neposredno iz mešane kulture, porasle iz zasajenih respiratornih kužnin. Po navodilih testa naj bi to test tudi omogočal. Toda drugi raziskovalci so svoje vrednosti

občutljivosti računali iz rezultatov, kjer so test izvedli iz čiste kulture posameznih streptokoknih sevov (Denys in Carey, 1992).

5.5 IN-HOUSE HKRATNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

V literaturi najdemo veliko zapisov o testih PCR za zaznavanje bakterije *S. pneumoniae* v vzorcih. Raziskovalci so vrednotili različne začetne oligonukleotide s klasičnim PCR-testom z različno uspešnostjo. Matos in sodelavci (2006) so ocenili uporabo testa PCR za pomnoževanje gena *ply* za diagnosticiranje meningitisa, ki ga povzroča *S. pneumoniae*. Uporabili so 106 vzorcev likvorja bolnikov s potrjenim pnevmokoknim meningitisom. Ko so izvedli PCR-test, so izračunali občutljivost, ki je bila 96-odstotna, in specifičnost, ki je bila stoodstotna. Obe vrednosti sta bili precej višji kot pri klasičnih metodah za diagnosticiranje pnevmokoknega meningitisa, zato so zaključili, da je PCR uporabna in zanesljiva metoda za identifikacijo povzročitelja bakterijskega meningitisa. Michelow in sodelavci (2002) so primerjali PCR, specifičen za gen *ply*, in hemokulture, serološke teste ter test za zaznavanje topnega pnevmokoknega antigena v urinu. Vrednotili so vzorce 184 otrok, od tega 154 z okužbo spodnjih dihal. Vse otroke so s kultivacijo brisov nosnega dela žrela testirali za nosilstvo *S. pneumoniae*. PCR so izvedli iz vzorcev krvi in ugotovili, da ima tak PCR-test visoko občutljivost (stoodstotno) pri vzorcih bolnikov, kjer je bila pnevmokokna okužba potrjen s kulturo. Ugotovili so še, da so rezultati ostalih metod primerljivi in da pnevmokokna kolonizacija nosnega dela žrela ne vpliva na rezultate PCR-testa. Butler in sodelavci (2003) so primerjali dve statistični metodi, s katerima so izračunali in nato primerjali med seboj občutljivost in specifičnost testa PCR za avtolizin, testa PCR za pnevmolizin in testa BinaxNOW. Rezultati obeh metod so bili podobni; PCR za avtolizin je imel občutljivost 82 % in specifičnost 38 %; PCR za pnevmolizin je imel občutljivost 89 % in specifičnost 27 %; BinaxNOW pa je imel občutljivost 77–78 % in specifičnost 67–71 %. Vrednosti so se razlikovale tudi glede na tip vzorca. Greve in sodelavci (2012) so testirali gen *lytA* za ločevanje bakterije *S. pneumoniae* od sorodnih vrst streptokokov. S testom PCR so pravilno zaznali vseh 46 izolatov *S. pneumoniae*. Pri vseh 49 izolatih sorodnih streptokokov, med njimi tudi več izolatov *S. mitis* in *S. pseudopneumoniae*, je bil PCR-test pravilno negativen. Scott in sodelavci (2003) so 171 bolnikom vzeli pljučne aspirate, hemokulture in vzorce urina. Iskali so bakterijo *S. pneumoniae*, zato so izvedli kultivacijo in zaznavanje topnega pnevmokoknega antigena v urinu. Pri vseh vzorcih so izvedli tudi PCR, specifičen za gen *psaA*. Skupaj s PCR-testom so zaznali pnevmokoke v več vzorcih kot samo s klasičnimi metodami. Imeli so nekaj lažno negativnih rezultatov, toda občutljivost testa PCR je bila kljub temu 83 %.

V literaturi imajo testi PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za gen *lytA*, boljše rezultate kot PCR-testi z začetnimi oligonukleotidi za gen *ply* in med drugim razlikujejo *S. pneumoniae* od *S. pseudopneumoniae* (Greve in Møller, 2012; McAvin in sod., 2001). Dobre rezultate je dala tudi raziskava Parka s sodelavci (2010), kjer so za razlikovanje *S.*

pneumoniae od ostalih zelenečih streptokokov uporabili začetne oligonukleotide, specifične za gen *cpsA*. Začetne oligonukleotide so testirali na 26 pnevmokoknih sevih in 108 streptokoknih sevih. PCR-test s tem setom začetnih oligonukleotidov je dal boljše rezultate kot testi PCR, pri katerih so uporabili začetne oligonukleotide za gene *lytA*, *ply* in *Spn9802*. Začetni oligonukleotidi, specifični za gen *cpsA*, so uspešno razlikovali tudi med sevi *S. pneumoniae* in *S. pseudopneumoniae*. Zato smo se odločili, da bomo v našem in-house hkratnem PCR-testu uporabili tudi te začetne oligonukleotide.

Test smo uporabili v predhodni raziskavi (Lužnik in sod., 2015), kjer smo ga primerjali s komercialnim testom Seeplex Pneumobacter ACE Detection (Seegene, Seul, Koreja) za zaznavanje pnevmokokov. Oba testa smo najprej vrednotili na 40 znanih streptokoknih sevih, nato smo izvedli raziskavo na 207 brisih žrela. Ugotovili smo, da je in-house hkratni PCR-test veliko bolj specifičen kot komercialni Seeplex Pneumobacter test, ki je imel veliko lažno pozitivnih rezultatov. Zaradi slabe specifičnosti testa Seeplex Pneumobacter smo se odločili, da testa v nadaljevanju raziskovanja ne bomo uporabljali.

Za potrebe doktorske disertacije smo z in-house hkratni PCR-testom, specifičnim za *S. pneumoniae*, testirali izolate DNK vseh 320 respiratornih vzorcev. Neveljaven rezultat zaradi manjkajoče interne kontrole smo dobili pri 56 vzorcih. Pri ostalih 264 vzorcih smo dobili devetnajst (7,2 %) pozitivnih rezultatov. Pri vzorcih bolnikov z apKOPB smo dobili štiri (8,2 %) pozitivne rezultate, pri vzorcih bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico trinajst (14,3 %) pozitivnih rezultatov in pri vzorcih bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, dva (1,6 %) pozitivna rezultata. Pozitivnih rezultatov je bilo manj kot pri kultivaciji respiratornih vzorcev, edino pri vzorcih bolnikov z apKOPB je bil delež pozitivnih rezultatov nekoliko višji. V literaturi raziskovalci poročajo o višji občutljivosti testa PCR, kot jo ima kultivacija.

Naši rezultati niso pokazali tega, zato smo sklepali, da ima naš test prenizko občutljivost.

Z Bayesovim modelom računanja verjetnosti smo izračunali specifičnost in občutljivost in-house hkratnega PCR-testa. Odkrili smo visoko specifičnost testa (98-odstotno) in nižjo občutljivost (59-odstotno). Visoka specifičnost testa je bila pričakovana, za te začetne oligonukleotide je visoka občutljivost že opisana (McAvin in sod., 2001; Park in sod. 2010). Ugotovili smo, da je število pozitivnih rezultatov in-house hkratnega PCR-testa primerljivo s številom pozitivnih rezultatov kultivacije respiratornih vzorcev. Predvidevali smo, da zato tudi občutljivost testa ne more biti bistveno drugačna. Občutljivost in-house hkratnega PCR-testa je sicer za devetnajst odstotnih točk višja od občutljivosti kultivacije, toda še vedno nižja od naših pričakovanj. Taka občutljivost je tudi precej nižja od občutljivosti za te začetne oligonukleotide, objavljene v literaturi (McAvin in sod., 2001; Park in sod. 2010). Omenjena občutna razlika je verjetno posledica tega, da smo mi pripravili hkratni PCR-test, ki je manj občutljiv od testa PCR z enim samim setom začetnih

oligonukleotidov oz. potrebuje zahtevnejšo optimizacijo, ki nam verjetno kljub trudu ni dovolj dobro uspela. To se je pokazalo že ob določanju spodnje meje zaznave ključnih tarčnih genov v vzorcih z znano količino bakterij *S. pneumoniae*, kjer se je in-house hkratni PCR-test izkazal bistveno slabše od in-house qPCR-testa.

V literaturi je opisano, da se pri optimizaciji hkratnega PCR-testa lahko soočimo z več težavami, vključno s slabo občutljivostjo in specifičnostjo ter s prednostnim pomnoževanjem določenih tarč (Elnifro in sod., 2000). Prisotnost več kot enega para začetnih oligonukleotidov v hkratnem testu PCR poveča možnost nastanka lažnih produktov pomnoževanja, najpogosteje zaradi tvorbe dimerov začetnih oligonukleotidov. Ti nespecifični produkti se lahko pomnožujejo uspešnejše kot tarča, porabljajo komponente reakcijske mešanice in v PCR-reakciji oslabijo fazo naleganja in podaljševanja (Elnifro in sod., 2000). Prednostno pomnoževanje enega tarčnega zaporedja pred drugim je tudi znana težava hkratnega PCR-testa, ki je namenjen hkratnemu pomnoževanju več kot ene tarče. Glede na teoretične modele in eksperimentalne raziskave obstajata dva postopka, ki povzročata to težavo, PCR-premik (angl. PCR drift) in PCR-izbor (angl. PCR selection). Za premik PCR predvidevajo, da je posledica naključnega nihanja v interakcijah reagentov PCR v začetnih ciklih reakcije. Pojavi se ob zelo nizkih koncentracijah tarčnih zaporedij, spremembah v temperaturnih profilih ali zaradi enostavne eksperimentalne napake (Elnifro in sod., 2000). Izbor PCR je definiran kot mehanizem, ki je bolj naklonjen pomnoževanju določenih tarč zaradi njihovih lastnosti, kot so zaporedja na obeh koncih tarče, celoten tarčni genom in razlike v vsebnosti GC-baz (Elnifro in sod., 2000).

5.6 IN-HOUSE VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Zaradi malo pozitivnih rezultatov in-house hkratnega PCR-testa, specifičnega za *S. pneumoniae*, smo izvedli in-house PCR v realnem času, specifičen za *S. pneumoniae*. V literaturi poročajo o višji občutljivosti in specifičnosti tega testa. Carvalho in sodelavci (2007) so izvedli PCR v realnem času in primerjali različne začetne oligonukleotide (specifične za gene *lytA*, *ply*, in *psaA*) med seboj. Vsi začetni oligonukleotidi so dali dobre rezultate, toda začetni oligonukleotidi za *lytA* so bili najboljši in so dali tudi najbolj specifične rezultate. McAvin in sodelavci (2001) so razvili PCR v realnem času, specifičen za gen *lytA*. S testom so pravilno identificirali vse seve brez lažno pozitivnih rezultatov in dobili stodontno občutljivost in specifičnost na kulturi. Pokazali so, da je ta novo razviti PCR v realnem času občutljiv in specifičen in kaže možnost za uporabo v klinični diagnostiki. 54 izolatov, za katere so domnevali, da so *S. pneumoniae*, so Wessels in sodelavci (2012) poskušali identificirati z različnimi metodami (topnost kolonij v žolču, občutljivost za optohin, MALDI-TOF MS, PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi za Spn9802 in *lytA* in sekvenčna analiza genov *tuf* in *rpoB*). Najmanj lažnih rezultatov so dobili s PCR v realnem času, zato so zaključili, da je ta metoda

najprimernejša za identifikacijo in razlikovanje med *S. pneumoniae* in *S. pseudopneumoniae*. Abdeldaim in sodelavci (2010) so razvili hkratni PCR v realnem času za zaznavanje *S. pneumoniae*, *H. influenzae* in *N. meningitidis*. Zbrali so bronhoalveolarne lavaže 156 bolnikov z okužbo spodnjih dihal, 31 kontrol in 87 vzorcev likvorja. Za PCR, specifičen za *S. pneumoniae*, so uporabili začetne oligonukleotide Spn9802. Hkratni PCR v realnem času je imel 95-odstotno občutljivost in 75-odstotno specifičnost za bakterijo *S. pneumoniae*. Azzari in sodelavci (2011) so izvedli PCR v realnem času, ki cilja gen *lytA*, na vzorcih krvi 147 otrok. Najprej so ugotovili, da je od teh otrok 77 (52,4 %) asimptomatskih nosilcev *S. pneumoniae*. Nato so izvedli PCR v realnem času na vzorcih krvi in ugotovili, da pnevmokokne DNK ne moremo zaznati v krvi zdravih nosilcev *S. pneumoniae*. Yang in sodelavci (2005) so testirali uporabnost PCR-testa v realnem času za zaznavanje *S. pneumoniae* v 129 vzorcih izmečka pri bolnikih z zunajbolnišnično pljučnico. Za PCR v realnem času so uporabili začetne oligonukleotide, ki ciljajo pnevmolizin. Pnevmonokno pljučnico so diagnosticirali tudi s pomočjo hemokultur, gramskih razmazov in kulture izmečkov, zato so lahko izračunali občutljivost, ki je bila 90-odstotna, in specifičnost, ki je bila 80-odstotna. Raziskovalci so računali občutljivost in specifičnost testa PCR tudi samo glede na pnevmokokno kulturo, poraslo iz vzorcev zgornjih dihal. Scott in sodelavci (2003) so kultivirali 171 pljučnih aspiratov in hkrati izvedli tudi PCR, specifičen za pnevmokokni gen *psaA*. Občutljivost testa PCR so izračunali s pomočjo 35 vzorcev, iz katerih so porasli pnevmokoki. Izračunana občutljivost njihovega PCR-testa je bila 83 %. Greiner in sodelavci (2001) so odvzeli 195 izločkov nosnega dela žrela in izvedli kultivacijo ter PCR v realnem času, specifično za gen *ply*. Rezultate testa qPCR so primerjali z rezultati kulture in izračunali stoodstotno občutljivost ter 96-odstotno specifičnost.

Z Bayesovim modelom računanja verjetnosti smo izračunali specifičnost in občutljivost in-house PCR-testa v realnem času. Ugotovili smo visoko specifičnost testa (92 %) in tudi visoko občutljivost (85 %). Visoka specifičnost in občutljivost testa sta bili pričakovani, za te začetne oligonukleotide je visoka specifičnost in občutljivost že opisana (McAvin in sod., 2001; Park in sod., 2010). Izračunana občutljivost je najvišja od vseh metod, uporabljenih v tej raziskavi. Nasprotno pa ima in-house PCR-test v realnem času najnižjo specifičnost od vseh metod, uporabljenih v raziskavi. To je posledica zelo visoke občutljivosti, velikega števila pozitivnih rezultatov in načina, s katerim z Bayesovim modelom računanja verjetnosti računamo občutljivosti.

Za in-house qPCR smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za gen *lytA*, ki imajo glede na literaturo odlično občutljivost in specifičnost. Odločili smo se za začetne oligonukleotide, ki so jih razvili McAvin in sodelavci (2001). Ti raziskovalci so pripravili začetne oligonukleotide in PCR v realnem času, specifičen za gen *lytA*. S testom so pravilno identificirali vse testne seve in dosegli stoodstotno občutljivost in specifičnost. Iste začetne oligonukleotide so uporabili tudi Saravolatz in sodelavci (2007). Brise nosnega

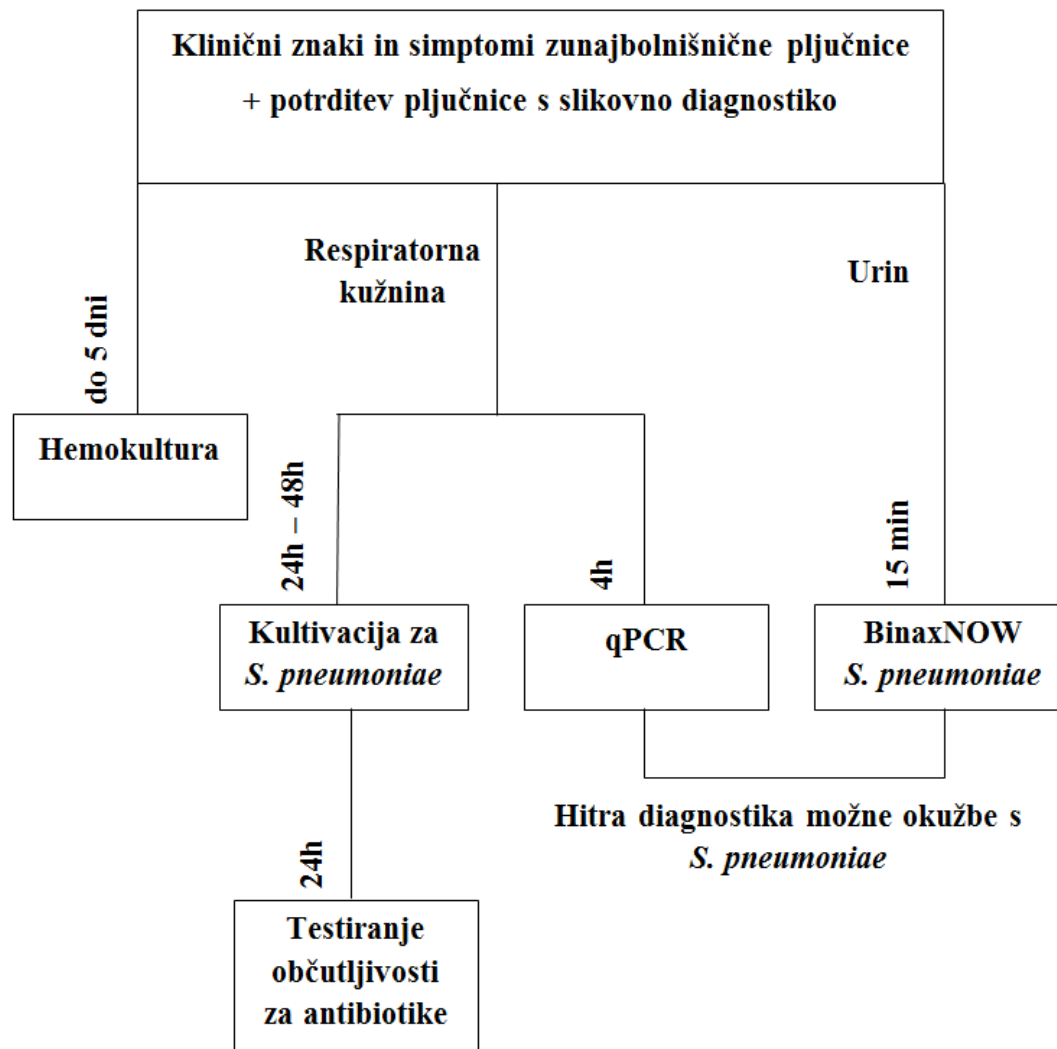
dela žrela so odvzeli 200 osebam in jih kultivirali ter hkrati testirali s qPCR-testom. PCR-testu z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za gen *lytA*, so glede na poraslo pnevmokokno kulturo izračunali občutljivost, specifičnost ter pozitivno in negativno napovedno vrednost. Ugotovili so stodontno občutljivost, 90,4-odstotno specifičnost, 13,6-odstotno pozitivno ter stodontno negativno napovedno vrednost. Predvidevali so, da je nizka pozitivna napovedna vrednost posledica tega, da je klasična mikrobiološka kultivacija respiratornih vzorcev bistveno manj občutljiva od tehnike PCR. Njihov PCR-test se je izkazal kot visoko specifičen, nobeni vzorci z močno sorodnimi zelenečimi streptokoki niso bili lažno pozitivni, zato so raziskovalci zaključili, da s takim testom PCR lahko hitro in zanesljivo identificirajo bakterijo *S. pneumoniae*. V naši raziskavi smo z in-house qPCR-testom dobili največ pozitivnih rezultatov, kar potrjuje, da ima PCR v realnem času od vseh uporabljenih metod v naši raziskavi najvišjo občutljivost. Skupno smo dobili 51 (15,9 %) pozitivnih rezultatov, od tega smo dobili pet (9,1 %) pozitivnih rezultatov pri vzorcih bolnikov z apKOPB, 32 (30,2 %) pozitivnih rezultatov pri vzorcih bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico in štirinajst (8,8 %) pozitivnih rezultatov pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni. S tako visoko občutljivostjo bi moral test zaznati tudi manjše koncentracije pnevmokoknih celic, ki bi jih lahko pripisali kolonizaciji.

5.7 KOMBINACIJA METOD

S kombinacijo različnih metod smo dobili višje število pozitivnih rezultatov kot s katerokoli posamezno metodo. Ko smo upoštevali vsak vzorec, ki je bil pozitiven z vsaj eno metodo, smo pri skupini bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico dobili 40 (37,7 %) pozitivnih rezultatov, osem (14,6 %) pozitivnih rezultatov pri bolnikih z apKOPB in 29 (18,2 %) pozitivnih rezultatov pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni. S kombinacijo metod smo pri skupini bolnikov s pljučnico zaznali 7,5 odstotne točke več pozitivnih rezultatov kot z najobčutljivejšo posamezno metodo. Pri skupini bolnikov z apKOPB smo zaznali 5,5 odstotne točke več pozitivnih rezultatov in pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, 8,2 odstotne točke več pozitivnih rezultatov. Glede na klinične podatke smo pozitivne rezultate kombinacije metod pri bolnikih z apKOPB in pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, šteli kot posledico pnevmokokne kolonizacije. V začetku našega raziskovalnega dela smo predvidevali, da z ustrezno kombinacijo testov lahko povečamo število pravilno dokazanih pnevmokoknih okužb. To hipotezo nam je z našimi rezultati uspelo potrditi.

Zanimiv rezultat je pri bolnikih z zunajbolnišnično pljučnico dala kombinacija testov in-house qPCR in BinaxNOW *S. pneumoniae*. Dobili smo 37 (34,9 %) pozitivnih rezultatov, kar je le 2,8 odstotne točke manj pozitivnih rezultatov kot s kombinacijo vseh metod. Ta kombinacija le dveh testov bi bila primeren diagnostični algoritem za ugotavljanje možnosti pnevmokokne okužbe dihal, saj je zaznala prisotnost pnevmokokov v večini vzorcev bolnikov s pljučnico, v katerih smo s katerokoli metodo dokazali pnevmokoke. S

tako kombinacijo metod lahko možnost pnevmokokne okužbe sporočimo zdravniku v nekaj urah in omogočimo zgodnje zdravljenje bolnika s penicilini (Slika 13).



Slika 13: Diagnostični algoritem za dokazovanje pnevmokoknih okužb dihal

Figure 13: Combination of methods for the identification of pneumococcal respiratory infections

Za doseganje boljših rezultatov pri laboratorijskem dokazovanju *S. pneumoniae* so se podobne kombinacije metod lotili tudi drugi raziskovalci. Vernet in sodelavci (2011) so povzeli zaključke srečanja, kjer so vrednotili različne metode za diagnozo pnevmokokne pljučnice. Glavna priporočila za diagnostične teste za zaznavanje pnevmokokne pljučnice so bila, da se uporabi kombinacija rentgenskega posnetka pljuč in zaznavanja topnega antigena v urinu, kadar je možno, pa še hemokulture. Potrdili so tudi obetavne rezultate testa PCR v realnem času na respiratornih vzorcih in merjenja CRP ali PCT v serumu, toda vseeno so priporočili nadaljnje raziskave teh testov. Said in sodelavci (2013) so v pregledu literature s kombinacijo različnih diagnostičnih testov (BinaxNOW *S. pneumoniae*,

hemokulture, kultivacija izmečka) ugotavljali, koliko k pozitivnemu rezultatu pripomore posamezna metoda. Ugotovili so, da je pozitivnih hemokultur oz. bakteriemičnih pnevmokoknih pljučnic pri bolnikih 24,8 %. Ugotovili so tudi, da je s testom BinaxNOW *S. pneumoniae* mogoče identificirati dodatnih 11,4 % pnevmokoknih pljučnic, ki so izven dosega zaznave s klasičnimi metodami. Briones in sodelavci (2006) so s testom BinaxNOW *S. pneumoniae* testirali 911 vzorcev urina bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico in vzorce urina bolnikov dveh kontrolnih skupin, ki so bili hospitalizirani zaradi KOPB ali astme in zaradi drugih neinfektivnih razlogov. Povzročitelja pljučnice so ugotavljali tudi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami. Z urinskim antigenom so ugotovili 279 pozitivnih rezultatov, s klasičnimi mikrobiološkimi metodami pa so ugotovili povzročitelja pljučnice pri 253 primerih. S testiranjem urinskega antigena se je delež pravilne diagnoze pnevmokokne pljučnice dvignil za 26 % in v kombinaciji s klasičnimi mikrobiološkimi metodami so povzročitelja pljučnice ugotovili kar v 49 %. Različne metode so uporabili tudi Saha in sodelavci (2015), ki so s kombinacijo klasičnih metod (kultivacija, reakcija nabrekanja in serotipizacija), testa PCR in računskih metod ugotavljali kolonizacijo in serotipe *S. pneumoniae* pri zdravih otrocih, mlajših od pet let. Od 212 brisov nosu so *S. pneumoniae* odkrili pri 125 vzorcih (59 %). Našli so 46 različnih serotipov, od tega pri 22 % vzorcev več različnih serotipov.

37,7 % pozitivnih vzorcev pri bolnikih z zunajbolnišnično pljučnico je bilo pričakovanih. Podobne rezultate najdemo v literaturi, na primer v raziskavi Cvitković Špič in sodelavcev (2013), ki so zaznali pnevmokoke pri 44 % odraslih s pljučnico, ter v raziskavi Saida in sodelavcev (2013), ki so pri bolnikih s pljučnico ugotovili 24,8 % bakteriemičnih pnevmokoknih pljučnic. Podobne rezultate so dobili tudi Aydemir in sodelavci (2014), ki so v respiratornih vzorcih 197 bolnikov z okužbo spodnjih dihal iskali različne bakterijske patogene. Izvedli so kultivacijo in hkratni PCR. S kultivacijo so *S. pneumoniae* zaznali v 16,9 % vzorcev, s hkratnim PCR-testom pa v 32 % vzorcev. Poleg zanimivih rezultatov so tudi potrdili, da je test PCR boljši za zaznavanje bakterijskih patogenov v respiratornih vzorcih. Ob kulturi kot zlatem standardu so izračunali tudi občutljivost in specifičnost PCR-testa, ki sta bili 96 % in 95 %.

14,6 % vzorcev bolnikov z apKOPB, pri katerih smo zaznali *S. pneumoniae* in s tem določili delež koloniziranih bolnikov, je v podobnem območju z rezultati, ki jih zasledimo v literaturi. Cabello in sodelavci (1997) so 100 bolnikom (33 bolnikov z rakom, 18 s KOPB, 17 bolnikov z bronhiektazijami, 32 s traheostomijo) in šestnajstim zdravim osebam odvzeli bronhoskopske vzorce in jih s pomočjo redčenja kvantitativno zasadili. Pri bolnikih s KOPB so ugotovili kolonizacijo z vsaj eno bakterijo pri 83 % (petnajst bolnikov). Pri teh bolnikih so najpogosteje odkrili streptokoke (enajst vzorcev), *S. pneumoniae* so našli v dveh (11 %) vzorcih. Zaključili so, da je bakterijska kolonizacija pri kronični bolezni pljuč pogosta, da pa se sestava razlikuje med posameznimi boleznimi. Sethi in Murphy (2001) v svojem članku pišeta, da je pomembnost *S. pneumoniae* pri bolnikih s KOPB težko

določiti, saj pnevmokoke velikokrat izolirajo iz izmečka tudi pri posameznikih brez klinične okužbe, in da zanesljiva metoda, ki bi razlikovala med klinično okužbo in kolonizacijo, trenutno ne obstoja. Navajata, da različne prevalenčne raziskave kažejo, da je od deset do dvajset odstotkov zdravih odraslih posameznikov koloniziranih s *S. pneumoniae*. Pri bolnikih z apKOPB pa podatki kažejo, da je od sedem do 26 % takih bolnikov koloniziranih s *S. pneumoniae*.

Rezultati naše raziskave samo potrjujejo te podatke, saj sta tako delež koloniziranih bolnikov z apKOPB kot delež koloniziranih posameznikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, podobna kot v literaturi.

5.8 KOLONIZACIJA Z BAKTERIJO *S. pneumoniae*

Zdravi posamezniki so lahko asimptomatski nosilci *S. pneumoniae*, kar je znano dejstvo. Glede na klinične podatke smo pozitivne rezultate pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, šteli kot posledico pnevmokokne kolonizacije. V naši raziskavi smo ugotovili 18,2 % pozitivnih vzorcev pri teh bolnikih, kar se ujema z literaturo (Sethi in Murphy, 2001).

Najdemo tudi nekaj raziskav, kjer je delež asimptomatskih nosilcev nižji, kot smo ga odkrili z našo raziskavo. Goldblatt in sodelavci (2005) so zbirali brise nosnega dela žrela in vzorce seruma družin z malimi otroki ter ugotavljali kolonizacijo s *S. pneumoniae* in protitelesni odziv, ki bi bil posledica kolonizacije. Najvišji delež kolonizacije je bil pri otrocih do dveh let (52 %) in najnižji pri odraslih, kjer je bil le 8 %. Kolonizacija pri odraslih je povzročila le šibek protitelesni odziv. Gualdoni in sodelavci (2012) so 79 študentom medicine vzeli brise nosne sluznice in izvedli kultivacijo na ustreznih gojiščih. Pri 25,3 % so odkrili *S. aureus*, *S. pneumoniae* niso našli. Višje deleže so odkrili le tisti raziskovalci, ki so preučevali otroke ali prebivalstvo tretjega sveta. Brugger in sodelavci (2010) so preučevali nosilstvo *S. pneumoniae* kot tudi hkratno nosilstvo več sevov *S. pneumoniae*. Zbrali so 1120 brisov posameznikov; polovica jih je bila mlajših od pet let. Izvedli so kultivacijo kot tudi PCR. Ko so združili rezultate obeh metod, so nosilstvo odkrili pri 45,8 % posameznikov. Med vzorci posameznikov, pri katerih so odkrili *S. pneumoniae*, je bil delež hkratnega nosilstva več sevov *S. pneumoniae* 7,9 %. Hill in sodelavci (2006) so raziskovali, kolikšen je delež nosilcev *S. pneumoniae* pri podeželskem prebivalstvu v Gambiji. 2872 prebivalcem vasi so odvzeli brise nosnega dela žrela in izvedli kultivacijo. Nosilstvo so ugotovili pri 72 % vseh vaščanov. Odstotek je padal s starostjo, pri otrocih, mlajših od enega leta, je bil kar 97 %, pri odraslih, starejši od 40 let, je bil 51 %.

V začetku našega raziskovalnega dela smo postavili hipotezo, da je del zdrave odrasle populacije koloniziran z bakterijo *S. pneumoniae*. To smo z našo raziskavo potrdili, saj

smo pri zdravi populaciji kolonizacijo s pnevmokoki ugotovili pri 18,2 %. Glede na literaturo in naše rezultate kaže, da ima od vseh uporabljenih metod za zaznavanje pnevmokokov le test BinaxNOW za zaznavanje urinskega pnevmokoknega antigena zmožnost ločevati med pnevmokokno okužbo in pnevmokokno kolonizacijo. Test je pozitiven le pri akutni pnevmokokni okužbi. Zato pri bolnikih s pljučnico, ki imajo iz respiratornih kužnin identificiran pnevmokok, urinski antigen pa je negativen, lahko sklepamo, da pnevmokok morda ni povzročitelj pljučnice in da je identifikacija pnevmokoka posledica pnevmokokne kolonizacije.

Postavili smo tudi hipotezo, da bomo odkrili več bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo, ki so kolonizirani z bakterijo *S. pneumoniae*, kot zdravih ljudi, ki so kolonizirani s pnevmokoki. Tega nam ni uspelo dokazati, saj med našimi rezultati bolnikov z apKOPB in rezultati bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, nismo odkrili statistično pomembne razlike.

6 SKLEPI

- S kombinacijo različnih metod za dokazovanje bakterije *S. pneumoniae* smo dobili višje število pozitivnih vzorcev kot s katerokoli posamezno metodo. Potrdili smo hipotezo, da z ustrezno kombinacijo testov lahko ugotovimo večje število okužb, kjer je najverjetnejši povzročitelj bakterija *S. pneumoniae*, in omogočimo ciljano antibiotično zdravljenje s penicilini.
- Pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi zunajbolnišnične pljučnice, smo verjetno pnevmokokno etiologijo pljučnice ugotovili pri 37,7 % bolnikov.
- Pri bolnikih z apKOPB smo ugotovili 14,6 % bolnikov, koloniziranih z bakterijo *S. pneumoniae*.
- Pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni brez bakterijske okužbe, smo ugotovili 18,2 % bolnikov, koloniziranih z bakterijo *S. pneumoniae*, kar potrjuje hipotezo, da je delež zdrave odrasle populacije koloniziran z bakterijo *S. pneumoniae*.
- Med deležem bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, ki so kolonizirani s *S. pneumoniae*, in deležem bolnikov z apKOPB, ki so kolonizirani s *S. pneumoniae*, nismo odkrili statistično pomembne razlike. S tem nam ni uspelo potrditi hipoteze, da je delež bolnikov s KOPB, koloniziranih z bakterijo *S. pneumoniae*, višji kot pri zdravih ljudeh.
- Test BinaxNOW za zaznavanje pnevmokoknega urinskega antigena ima visoko specifičnost. Nakazano možnost uporabe tega testa za ločevanje med pnevmokokno okužbo in pnevmokokno kolonizacijo bi bilo treba preveriti z nadaljnjo raziskavo.
- Kombinacija dveh testov, in-house qPCR in BinaxNOW *S. pneumoniae*, se je pokazala kot primeren diagnostični algoritem za ugotavljanje možne pnevmokokne okužbe dihal, saj je zaznala prisotnost pnevmokokov v večini vzorcev bolnikov s pljučnico, v katerih smo s katerokoli metodo dokazali pnevmokoke (Slika 13).

7 POVZETEK

Okužbe spodnjih dihal so vodilni vzrok obolevnosti in pomemben vzrok smrtnosti po celem svetu. Najpogostejši povzročitelj je *Streptococcus pneumoniae*, saj je vzrok za dve tretjini bakterijskih pljučnic tako pri odraslih kot tudi pri otrocih. Postavitev diagnoze pnevmokokne pljučnice z uporabo klasičnih mikrobioloških tehnik je zahtevna, saj metoda izolacije bakterije iz krvi ni dovolj občutljiva, kultivacija iz izmečka lahko predstavlja kolonizacijo, invazivne metode odvzema vzorca pa se izvajajo le redko. Z uporabo več različnih mikrobioloških metod za ugotavljanje prisotnosti bakterije *S. pneumoniae* smo želeli ustvariti diagnostični algoritem za dokazovanje pnevmokoknih okužb dihal, s čimer bi omogočili večjo uporabo penicilina za zdravljenje okužb spodnjih dihal. Dobiti smo želeli tudi epidemiološke podatke o razširjenosti kolonizacije z bakterijo *S. pneumoniae* pri različnih populacijah.

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti pogostost *S. pneumoniae* pri treh skupinah bolnikov, hospitaliziranih na Kliniki Golnik. Zbrali smo respiratorne in urinske vzorce 106 bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico, 55 bolnikov z apKOPB in 159 bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni. Izvedli smo kultivacijo respiratornih kužnin in iz porasle kulture respiratornih vzorcev izvedli hibridizacijski test AccuProbe *S. pneumoniae*. Vsem respiratornim vzorcem smo izolirali DNK, iz izolatov DNK pa smo izvedli in-house hkratni PCR ter in-house qPCR-test, specifična za *S. pneumoniae*. Urinske vzorce smo testirali s testom BinaxNOW za zaznavanje topnega pnevmokoknega antigena. V odsotnosti zlatega standarda smo občutljivost in specifičnost posameznih metod izračunali z uporabo Bayesovega modela računanja verjetnosti.

Testirali smo 320 vzorcev z vsemi petimi metodami in glede na metodo dobili od devetnajst (6,3 %) do 51 (15,9 %) pozitivnih rezultatov. Metoda z največ pozitivnimi rezultati in z največjo občutljivostjo je bila PCR v realnem času. Največ pozitivnih rezultatov smo dobili pri vzorcih bolnikov s pljučnico, saj je bilo glede na metodo od 10,5 % do 30,2 % vzorcev pozitivnih. Pri bolnikih z apKOPB smo dobili od 0 % do 9,1 % in pri skupini bolnikov z drugimi boleznimi od 1,6 % do 10,0 % pozitivnih rezultatov.

S kombinacijo različnih metod za dokazovanje pnevmokokov smo ugotovili pogostost bakterije *S. pneumoniae* v posamezni skupini bolnikov. Pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi zunajbolnišnične pljučnice, smo pozitiven rezultat dobili pri 40 (37,7 %) bolnikih. Rezultat je bil pričakovano zaradi visokega deleža pnevmokokne pljučnice pri tej skupini bolnikov. V skupini bolnikov z apKOPB smo odkrili osem (14,6 %), v skupini bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni brez bakterijske okužbe, pa 29 (18,2 %) bolnikov. Med deležem bolnikov, hospitaliziranih zaradi drugih bolezni, in deležem bolnikov z apKOPB nismo odkrili statistično pomembne razlike.

Kombinacija testov in-house qPCR in BinaxNOW *S. pneumoniae* se je pokazala kot najprimernejša za ugotavljanje možnosti pnevmokokne okužbe dihal. Dobili smo 37 (34,9 %) pozitivnih rezultatov, kar je le 2,8 odstotne točke manj pozitivnih rezultatov kot s kombinacijo vseh metod. S tako kombinacijo metod lahko možnost pnevmokokne okužbe sporočimo zdravniku v nekaj urah in hitro omogočimo zdravljenje bolnika s penicilinom.

S kombinacijo različnih metod za dokazovanje bakterije *S. pneumoniae* smo dobili višje število pozitivnih vzorcev kot s katerokoli posamezno metodo. Test BinaxNOW za zaznavanje pnevmokoknega urinskega antigena ima visoko specifičnost. Za možnost uporabe tega testa za ločevanje med pnevmokokno okužbo in pnevmokokno kolonizacijo bi bila potrebna nadaljnja raziskava.

7.1 SUMMARY

Lower respiratory tract infections are the leading cause of morbidity and a significant cause of mortality worldwide. The most common cause of lower respiratory tract infections is *Streptococcus pneumoniae*. It is the cause of two thirds of bacterial pneumonia cases in adults as well as in children. Diagnosis of pneumococcal pneumonia using conventional microbiological techniques is difficult, because the isolation of bacteria from blood is not sensitive enough, the cultivation of sputum may represent colonization, and invasive methods of specimen collection are carried out only rarely. One of our goals was to create a diagnostic algorithm to detect pneumococcal respiratory tract infections for a greater use of penicillin therapy in lower respiratory tract infections. We also wanted to obtain the epidemiological data on the prevalence of *S. pneumoniae* colonisation in different groups of patients.

Our study was conducted to determine the frequency of *S. pneumoniae* in three groups of patients hospitalized at the University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik. Respiratory and urine samples were collected from 106 patients with community acquired pneumonia, 55 patients with AE COPD, and 159 patients who were hospitalized due to non-infectious reasons. All respiratory samples were cultivated on blood agar plates. Cultures of respiratory samples were also tested with the Genprobe AccuProbe test which is a hybridization test. DNA was isolated from all respiratory samples. In-house real-time PCR and in-house multiplex PCR, both specific to *S. pneumoniae*, were carried out from DNA isolates. Urine samples were tested with the BinaxNOW *S. pneumoniae* urinary antigen test. Sensitivity and specificity were also calculated.

While testing all 320 samples with different methods, we detected between 19 (6.3%) and 51 (15.9%) positive results, depending on the method. The method with the most positive results and the highest sensitivity was real-time PCR. The highest number of positive results was in the group of patients with CAP, where there were between 10.5% and 30.2% of positive results, depending on the method. In the group of patients with AE COPD, there were between 0.0% and 9.1% of positive results, and among patients, hospitalized due to non-infectious reasons, there were between 1.6% to 10.0% of positive results.

The frequency of *S. pneumoniae* in each group of hospitalized patients was determined with combined results of all five methods. 37.7% of samples of patients with CAP were positive for *S. pneumoniae*. The result was expected due to a high rate of pneumococcal pneumonia in that group of patients. 14.6% of samples from patients with COPD and 18.2% of samples from patients hospitalized due to non-infectious reasons were also positive for *S. pneumoniae*. Statistical analysis showed that the difference between the last two groups was statistically insignificant.

The combination of the in-house qPCR and Binax NOW *S. pneumoniae* tests is a suitable combination for the identification of pneumococcal respiratory infections. We obtained 37 (34.9%) positive results, which is only 2.8 percentage points less than with the combination of all methods. With the combination of the two methods the clinician can be informed of a possible pneumococcal infection within a few hours and penicillin treatment can be started shortly after that.

The combined results of different methods delivered more positive results than those of each individual method. The BinaxNOW test has high specificity. An indicated possibility to differentiate between pneumococcal infection and colonisation should be verified in a further study.

8 VIRI

- Abdeldaim G. M., Strålin K., Olcén P., Blomberg J., Herrmann B. 2008. Toward a quantitative DNA-based definition of pneumococcal pneumonia: a comparison of *Streptococcus pneumoniae* target genes, with special reference to the Spn9802 fragment. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60, 2: 143-150
- Abdeldaim G. M., Strålin K., Korsgaard J., Blomberg J., Welinder-Olsson C., Herrmann B. 2010. Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *BMC Microbiology*, 3, 10: 310, doi:10.1186/1471-2180-10-310: 9 str.
- Andreo F., Ruiz-Manzano J., Prat C., Lores L., Blanco S., Malet A., Gallardo X., Dominguez J. 2010. Utility of pneumococcal urinary antigen detection in diagnosing exacerbations in COPD patients. *Respiratory Medicine*, 104: 397-403
- Anthonisen N. R., Manfreda J., Warren C. P., Hershfield E. S., Harding G. K., Nelson N. A. 1987. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of Internal Medicine*, 106, 2:196–204
- Arbique J. C., Poyart C., Trieu-Cuot P., Quesne G., Carvalho Mda G., Steigerwalt A. G., Morey R. E., Jackson D., Davidson R. J., Facklam R. R. 2004. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 10: 4686-4696
- Aydemir O., Aydemir Y., Ozdemir M. 2014. The role of multiplex PCR test in identification of bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 30, 5: 1011-1016
- Azzari C., Cortimiglia M., Moriondo M., Canessa C., Lippi F., Ghiori F., Beccioli L., de Martino M., Resti M. 2011. Pneumococcal DNA is not detectable in the blood of healthy carrier children by real-time PCR targeting the *lytA* gene. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 6: 710-714
- Bandettini R., Melioli G. 2012. Laboratory diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *Journal of Preventive and Medical Hygiene*, 53: 85-88

- Banerjee D., Khair O. A., Honeybourne D. 2004. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD. *European Respiratory Journal*, 23, 5: 685-691
- Berry A. M., Paton J. C. 1996. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 64, 12: 5255-5262
- Bogaert D., Groot R., Hermans P. W. M. 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infectious Diseases*, 4: 144-145
- Boulware D. R., Daley C. L., Merrifield C., Hopewell P. C., Janoff E. N. 2007. Rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia among HIV-infected adults with urine antigen detection. *Journal of Infection*, 55, 4: 300-309
- Briones M. L., Blanquer J., Ferrando D., Blasco M. L., Gimeno C., Marín J. 2006. Assessment of analysis of urinary pneumococcal antigen by immunochromatography for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia in adults. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13, 10: 1092-1097
- Brugger S. D., Frey P., Aebi S., Hinds J., Mühlemann K. 2010. Multiple colonization with *S. pneumoniae* before and after introduction of the seven-valent conjugated pneumococcal polysaccharide vaccine. *PLoS One*, 5, 7: e11638, doi: 10.1371/journal.pone.0011638: 8 str.
- Butler J. C., Bosshardt S. C., Phelan M., Moroney S. M., Tondella M. L., Farley M. M., Schuchat A., Fields B. S. 2003. Classical and latent class analysis evaluation of sputum polymerase chain reaction and urine antigen testing for diagnosis of pneumococcal pneumonia in adults. *Journal of Infectious Diseases*, 187, 9: 1416-1423
- Cabello H., Torres A., Celis R., El-Ebiary M., de la Bellacasa J. P., Xaubet A., Gonzalez J., Agusti C., Soler N. 1997. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *European Respiratory Journal*, 10: 1137-1144
- Cardozo D. M., Nascimento-Carvalho C. M., Souza F. R., Silva N. M. 2006. Nasopharyngeal colonization and penicillin resistance among pneumococcal strains: a worldwide 2004 update. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 10, 4: 293-304

- Carvalho Mda G., Tondella M. L., McCaustland K., Weidlich L., McGee L., Mayer L. W., Steigerwalt A., Whaley M., Facklam R. R., Fields B., Carlone G., Ades E. W., Dagan R., Sampson J. S. 2007. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 8: 2460-2466
- Catterall J. R. 1999. *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax*, 54: 929–937
- Chalasani N. P., Valdecanas M. A., Gopal A. K., McGowan J. E. Jr., Jurado R. L. 1995. Clinical utility of blood cultures in adult patients with community-acquired pneumonia without defined underlying risks. *Chest*, 108, 4: 932-936
- Cundell D. R., Gerard N. P., Gerard C., Idanpaan-Heikkila I., Tuomanen E. I. 1995. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 5, 377, 6548: 435-438
- Cvitkovic Spik V., Beovic B., Pokorn M., Drole Torkar A., Vidmar D., Papst L., Seme K., Kogoj R., Müller Premru M. 2013. Improvement of pneumococcal pneumonia diagnostics by the use of rt-PCR on plasma and respiratory samples. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 45, 10: 731-737
- Denys G. A., Carey R. B. 1992. Identification of *Streptococcus pneumoniae* with a DNA probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 10: 2725-2727
- Diederer B. M., Peeters M. F. 2007. Rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adults using the BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test. *International Journal of Infectious Diseases*, 11, 3: 284-285
- Dilworth J. A., Stewart P., Gwaltney J. M. Jr., Hendley J. O., Sande M. A. 1975. Methods to improve detection of pneumococci in respiratory secretions. *Journal of Clinical Microbiology*, 2, 5: 453-455
- Domínguez J., Galí N., Blanco S., Pedroso P., Prat C., Matas L., Ausina V. 2001. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest*, 119, 1: 243-249
- Donkor E. S. 2013. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 7: 1-5, doi: 10.3389/fcimb.2013.00007: 5 str.

- Dowell S. F., Garman R. L., Liu G., Levine O. S., Yang Y.-H. 2001. Evaluation of BinaxNOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 824-825
- Drummond P., Clark J., Wheeler J., Galloway A., Freeman R., Cant A. 2000. Community acquired pneumonia-a prospective UK study. *Archives of Disease in Childhood*, 83, 5: 408-412
- Dupuy A. M., Philippart F., Péan Y., Lasocki S., Charles P. E., Chalumeau M., Claessens Y. E., Quenot J. P., Guen C. G., Ruiz S., Luyt C. E., Roche N., Stahl J. P., Bedos J. P., Pugin J., Gauzit R., Misset B., Brun-Buisson C.; Maurice Rapin Institute Biomarkers Group. 2013. Role of biomarkers in the management of antibiotic therapy: an expert panel review: I - currently available biomarkers for clinical use in acute infections. *Annals of Intensive Care*, 9, 3, 1: 22, doi: 10.1186/2110-5820-3-22: 8 str.
- El Aila N. A., Emler S., Kaijalainen T., De Baere T., Saerens B., Alkan E., Deschaght P., Verhelst R., Vaneechoutte M. 2010. The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. *BMC Infectious Diseases*, 29, 10: 104, doi: 10.1186/1471-2334-10-104: 8 str.
- Elnifro E. M., Ashshi A. M., Cooper R. J., Klapper P. E. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 4: 559-570
- Feldman C., Munro N. C., Jeffery P. K., Mitchell T. J., Andrew P. W., Boulnois G. J., Guerreiro D., Rohde J. A., Todd H. C., Cole P. J. 1991. Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 5, 5: 416-423
- Goldblatt D., Hussain M., Andrews N., Ashton L., Virta C., Melegaro A., Pebody R., George R., Soininen A., Edmunds J., Gay N., Kayhty H., Miller E. 2005. Antibody responses to nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in adults: a longitudinal household study. *Journal of Infectious Diseases*, 192, 3: 387-393
- Greiner, O., Day, P. J., Bosshard, P. P., Imeri, F., Altwegg, M. and Nadal, D. 2001. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 9: 3129-3134
- Greve T., Møller J. K. 2012. Accuracy of using the *lytA* gene to distinguish *Streptococcus pneumoniae* from related species. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 4: 478-482

- Gualdoni G. A., Lingscheid T., Tobudic S., Burgmann H. 2012. Low nasal carriage of drug-resistant bacteria among medical students in Vienna. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*, 7, 1: Doc04, doi: 10.3205/dgkh000188: 4 str.
- Hamer D. H., Egas J., Estrella B., MacLeod W. B., Griffiths J. K., Sempértegui F. 2002. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 7: 1025-1028
- Harmes K. M., Blackwood R. A., Burrows H. L., Cooke J. M., Van Harrison R., Passamani P. P. 2013. Otitis media: Diagnosis and treatment. *American Family Physician*, 88, 7: 435-440
- Hill P. C., Akisanya A., Sankareh K., Cheung Y. B., Saaka M., Lahai G., Greenwood B. M., Adegbola R. A. 2006. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian villagers. *Clinical Infectious Diseases*, 15, 43, 6: 673-679
- Holub M., Lawrence D. A., Andersen N., Davidová A., Beran O., Marešová V., Chalupa P. 2013. Cytokines and chemokines as biomarkers of community-acquired bacterial infection. *Mediators of Inflammation*, 2013: 190145, doi: 10.1155/2013/190145: 7 str.
- Horita N., Miyazawa N., Kojima R., Kimura N., Inoue M., Ishigatsubo Y., Kaneko T. 2013. Sensitivity and specificity of the *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test for unconcentrated urine from adult patients with pneumonia: a meta-analysis. *Respirology*, 18, 8: 1177-1183
- Jedrzejewski M. J. 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 187-207
- Kadioglu A., Taylor S., Iannelli F., Pozzi G., Mitchell T. J., Andrew P. W. 2002. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infection and Immunity*, 70, 6: 2886-2890
- Karcic E., Aljicevic M., Bektas S., Karcic B. 2015. Antimicrobial susceptibility/resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Materia Socio-Medica*, 27, 3: 180-184

- Keith E. R., Podmore R. G., Anderson T. P., Murdoch D. R. 2006. Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3: 923-927
- Keith J. M., Davey C. M., Boyd S. E. 2012. A Bayesian method for comparing and combining binary classifiers in the absence of a gold standard. *BMC Bioinformatics*, 13: 179, doi: 10.1186/1471-2105-13-179: 11 str.
- Kelly T., Dillard J. P., Yother J. 1994. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 62, 5: 1813-1819
- Kirn T. J., Weinstein M. P. 2013. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clinical Microbiology and Infection*, 19, 6: 513-520
- Klugman K. P., Madhi S. A., Albrich W. C. 2008. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community acquired pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 47, Suppl. 3: S202-S206
- Korsgaard J., Møller J. K., Kilian M. 2005. Antibiotic treatment and the diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* in lower respiratory tract infections in adults. *International Journal of Infectious Diseases*, 9, 5: 274-279
- Kraigher A., Sočan M., Klavs I., Frelih T., Grilc E., Grgič Vitek M., Učakar V., Kolman J. 2014. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2013. Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje: 118 str.
- Leibovitz E., Greenberg D. 2004. Acute otitis media in children: current epidemiology, microbiology, clinical manifestations, and treatment. *Chang Gung Medical Journal*, 27, 7: 475-488
- Lentino J. R., Lucks D. A. 1987. Nonvalue of sputum culture in the management of lower respiratory tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 5: 758-762
- Luna C. M., Famiglietti A., Absi R., Videla A. J., Nogueira F. J., Fuenzalida A. D., Gené R. J. 2000. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome at a teaching hospital in Argentina. *Chest*, 118, 5: 1344-1354
- Lunn D. J., Thomas A., Best N., Spiegelhalter D. 2000. WinBUGS - a Bayesian modelling framework; concepts, structure, and extensibility. *Statistics and Computing*, 10, 4: 325-337

- Luznik D., Kosnik M., Tomic V. 2015. Comparison of Seeplex PneumoBacter aCE detection assay and in-house multiplex PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *New Microbiologica*, 38, 1: 51-58
- Marcos M. A., Jiménez de Anta M. T., de la Bellacasa J. P., González J., Martínez E., García E., Mensa J., de Roux A., Torres A. 2003. Rapid urinary antigen test for diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults. *European Respiratory Journal*, 21, 2: 209-214
- Matos Jde A., Madureira D. J., Rebelo M. C., Hofer C. B., Barroso D. E. 2006. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* meningitis by polymerase chain reaction amplification of the gene for pneumolysin. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 5: 559-563
- McAvin J. C., Reilly P. A., Roudabush R. M., Barnes W. J., Salmen A., Jackson G. W., Beninga K. K., Astorga A., McCleskey F. K., Huff W. B., Niemeyer D., Lohman K. L. 2001. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 10: 3446-3451
- McDaniel L. S., Sheffield J. S., Delucchi, P., Briles D, E. 1991. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infection and Immunity*, 59, 1,: 222-228
- Michelow I. C., Lozano J., Olsen K., Goto C., Rollins N. K., Ghaffar F., Rodriguez-Cerrato V., Leinonen M., McCracken G. H. Jr. 2002. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing, and urinary antigen detection. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 1: E1-11
- Miravittles M., Espinosa C., Fernández-Laso E., Martos J. A., Maldonado J. A., Gallego M., Study Group of Bacterial Infection in COPD. 1999. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. *Chest*, 116, 1: 40-46
- Moffitt K. L., Malley R. 2011. Next generation pneumococcal vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 23, 3: 407-413
- Mook-Kanamori B. B., Geldhoff M, van der Poll T., van de Beek D. 2011. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 3: 557-591

- Morrison K. E., Lake D., Crook J., Carlone G. M., Ades E., Facklam R., Sampson J. 2000. Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 434-437
- Murdoch D. R., Anderson T. P., Beynon K. A., Chua A., Fleming A. M., Laing R. T., Town G. I., Mills G. D., Chambers S. T., Jennings L. C. 2003. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1: 63-66
- Murdoch D. R., Laing R. T. R., Cook J. M. 2003. The NOW *S. pneumoniae* urinary antigen test positivity rate 6 weeks after pneumonia onset and among patients with COPD. *Clinical Infectious Diseases*, 37: 153-154
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Tenover F. C., Tenover F. C. 2005. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby: 179-180
- Mustafa M. I., Al-Marzooq F., How S. H., Kuan Y. C., Ng T. H. 2011. The use of multiplex real-time PCR improves the detection of the bacterial etiology of community acquired pneumonia. *Journal of Tropical Biomedicine*, 28, 3: 531-544
- Nadkarni M. A., Martin F. E., Jacques N. A., Hunter N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148, Pt 1: 257-266
- Navarro D., García-Maset L., Gimeno C., Escribano A., García-de-Lomas J., Spanish Pneumococcal Infection Study Network. 2004. Performance of the BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen assay for diagnosis of pneumonia in children with underlying pulmonary diseases in the absence of acute pneumococcal infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 10: 4853-4855
- Nishimura K., Nishimura T., Oga T. 2012. *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test and acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 9: 344-351
- Örtqvist A., Hedlund J., Kalin M. 2005. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 26, 6: 563-574

- Pareson G. K., Orihuela C. J. 2010. Pneumococci: immunology of the innate host response. *Respirology*, 15, 7: 1057-1063
- Park H. K., Lee S. J., Yoon J. W., Shin J. W., Shin H. S., Kook J. K., Myung S. C., Kim W. 2010. Identification of the *cpsA* gene as a specific marker for the discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridans group streptococci. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 10: 1146-1152
- Patel I. S., Seemungal T. A., Wilks M., Lloyd-Owen S. J., Donaldson G. C., Wedzicha J. A. 2002. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax*, 57, 9: 759-764
- Pletz M. W., Maus U., Krug N., Welte T., Lode H. 2008. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32: 199-206
- Prère M. F., Fayet O. A. 2011. A specific polymerase chain reaction test for the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70, 1: 45-53
- Rodriguez-Roisin R. 2000. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest*, 117, 5, Suppl. 2: 398S-401S
- Rosell A., Monsó E., Soler N., Torres F., Angrill J., Riise G., Zalacaín R., Morera J., Torres A. 2005. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Archives of Internal Medicine*, 165, 8: 891-897
- Saha S., Modak J. K., Naziat H., Al-Emran H. M., Chowdury M., Islam M., Hossain B., Darmstadt G. L., Whitney C. G., Saha S. K. 2015. Detection of co-colonization with *Streptococcus pneumoniae* by algorithmic use of conventional and molecular methods. *Vaccine*, 29, 33, 5: 713-718
- Said M. A., Johnson H. L., Nonyane B. A., Deloria-Knoll M., O'Brien K. L.; AGEDD Adult Pneumococcal Burden Study Team. 2013. Estimating the burden of pneumococcal pneumonia among adults: a systematic review and meta-analysis of diagnostic techniques. *PLoS One*, 8, 4: e60273, doi: 10.1371/journal.pone.0060273: 13 str.
- Saravolatz L. D., Johnson L., Galloway L., Manzor O., Pawlak J., Belian B. 2007. Detection of *Streptococcus pneumoniae* colonisation in respiratory tract secretions of military personnel. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 9: 932-936

- Scott J. A., Marston E. L., Hall A. J., Marsh K. 2003. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by *psaA* PCR analysis of lung aspirates from adult patients in Kenya. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 6: 2554-2559
- Sethi S., Maloney J., Grove L., Wrona C., Berenson C. S. 2006. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173: 991-998
- Sethi S., Murphy T. F. 2001. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 2: 336-363
- Siafakas N. M., Vermeire P., Pride N. B., Paoletti P., Gibson J., Howard P., Yernault J. C., Decramer M., Higenbottam T., Postma D. S. 1995. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *European Respiratory Journal*, 8, 8: 1398-1420
- Sinclair A., Xie X., Teltscher M., Dendukuri N. 2013. Systematic review and meta-analysis of urine-based pneumococcal antigen test for diagnosis of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 7: 2303-2310
- Smith M. D., Derrington P., Evans R., Creek M., Morris R., Dance D. A., Cartwright K. 2003. Rapid diagnosis of bacteremic pneumococcal infections in adults by using the BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test: a prospective, controlled clinical evaluation. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 7: 2810-2813
- Snellman M. 2008. Case definition of pneumococcal pneumonia : a latent class analysis approach. Helsinki, National Public Health Institute: 50 str.
- Sondag J. E., Morgens R. K., Hoppe J. E., Marr J. J. 1977. Detection of pneumococci in respiratory secretions: clinical evaluation of gentamicin blood agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 5, 4: 397-400
- Song J. Y., Eun B. W., Nahm M. H. 2013. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: current pitfalls and the way forward. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 45, 4: 351-366
- Song J. Y., Moseley M. A., Burton R. L., Nahm M. H. 2013. Pneumococcal vaccine and opsonic pneumococcal antibody. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19, 3: 412-425

- Tomic V., Dowzicky M. J. 2014. Regional and global antimicrobial susceptibility among isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) from 2009 to 2012 and comparison with previous years of T.E.S.T. (2004-2008). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 7, 13: 52, doi: 10.1186/s12941-014-0052-2: 8 str.
- Tomič V., Šorli J. 2002. Diagnostična vrednost razmaza sputuma in endotrahealnega aspirata, obarvanega po Gramu. *Zdravniški vestnik*, 71: 83-86
- Vernet G., Saha S., Satzke C., Burgess D. H., Alderson M., Maisonneuve J. F., Beall B. W., Steinhoff M. C., Klugman K. P. 2011. Laboratory-based diagnosis of pneumococcal pneumonia: state of the art and unmet needs. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, Suppl. 3: S1-S13
- Werno A. M., Murdoch D. R. 2008. Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clinical Infectious Diseases*, 46: 926-932
- Wessels E., Schelfaut J. J. G., Bernardis A. T., Claas E. C. J. 2012. Evaluation of several biochemical and molecular techniques for identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae* and their detection in respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 4: 1171-1177
- WHO. 2014. Noncommunicable diseases country profiles 2014. Geneva, World Health Organization: 207 str.
- Wu S. C., Trask L. M., Phee R. E. 1980. Comparison of media and culture techniques for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory secretions. *Journal of Clinical Microbiology*, 12, 6: 772-775
- Yang S., Lin S., Khalil A., Gaydos C., Nuemberger E., Juan G., Hardick J., Bartlett J. G., Auwaerter P. G., Rothman R. E. 2005. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 7: 3221-3226
- Zalacain R., Sobradillo V., Amilibia J., Barrón J., Achótegui V., Pijoan J. I., Llorente J. L. 1999. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 13, 2: 343-348

ZAHVALA

Hvala mojemu mentorju prof. dr. Mitju Košniku, dr. med., za izkazano zaupanje, pozitivno kritiko in strokovne nasvete pri nastanku doktorske disertacije.

Hvala moji somentorici doc. dr. Viktoriji Tomič, dr. med., za vso strokovno pomoč in spodbudne besede med vsemi leti nastajanja naloge.

Agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije se zahvaljujem, da mi je v sklopu programa za mlade raziskovalce omogočila doktorski študij.

Zahvaljujem se vsem sodelavkam v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo, ki ste me vedno spodbujale in mi pomagale pri delu. Hvala Vesni Špendal, Judit Stokić, Nataši Fajfar, Mariji Teran, Andreji Jenko in Maruši Ravnik.

Hvala Juliju Šelbu za pomoč pri statistični analizi in vse dodatne nasvete glede obdelave podatkov.

Zahvaljujem se Anji Blažun za lektoriranje disertacije in drugo pomoč pri oblikovanju besedila.

Hvala vsem ostali sodelavcem na Kliniki Golnik, ki so kakorkoli doprinesli k nastanku doktorske disertacije. Še posebej hvala Romani Bajželj za urejanje dokumentacije za status mladega raziskovalca in Katji Ožbolt za tiskanje in vezavo delovnih verzij disertacije.

Hvala mojim staršem, ki mi stojijo ob strani in verjamejo vame.

Hvala tudi Urški za izkazano podporo in potrpežljivost.

PRILOGE

Priloga A: Seznam vzorcev bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
2		BAL	poz	Običajna mešana flora	/	poz	neg	sterilno	Pljučnica
4	3543	Aspirat tubusa	neg	/	/	poz	neg	<i>S. pneumoniae</i>	Pljučnica
5	3545	Izmeček	poz	Običajna mešana flora	/	poz	poz	sterilno	Pljučnica
6	3546	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Pljučnica
9	3590	Izmeček	/	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Pljučnica
10	3593	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Pljučnica
21	4038	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i>	/	poz	/	sterilno	Pljučnica
23	4096	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	/	neg	/	sterilno	Pljučnica
24	4097	Izmeček	/	Običajna mešana flora	/	poz	/	sterilno	Pljučnica
27	4114	Izmeček	/	Običajna mešana flora	/	poz	/	sterilno	Pljučnica
38	4309	Aspirat tubusa	neg	MSSA	neg	neg	/	<i>S. aureus</i>	Pljučnica
40	4321	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Pljučnica
44	4353	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	neg	/	Pljučnica
55	4957	Izmeček	poz	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	poz	<i>S. pneumoniae</i>	Pljučnica
60	4987	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	poz	sterilno	Pljučnica
62	4994	Aspirat traheje	neg	<i>K. pneumoniae</i>	neg	poz	neg	/	Pljučnica
63	5009	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	poz	neg	sterilno	Pljučnica
64	5068	Izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	poz	neg	/	Pljučnica
65	5069	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
68	5084	Izmeček	neg	<i>C. albicans</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
71	5460	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i>	poz	neg	neg	sterilno	Pljučnica
72	5461	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
73	5472	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
77	6080	Izmeček	neg	<i>P. aeruginosa, C. krusei</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
79	6085	Aspirat tubusa	neg	<i>E. coli, K. pneumoniae</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
80	6095	Izmeček	neg	MSSA, <i>P. aeruginosa</i>	neg	poz	neg	/	Pljučnica
83	6606	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
97	7982	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
103	8014	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
104	7980	Aspirat tubusa	poz	ni rasti	/	poz	poz	/	Pljučnica
105	8040	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev bolnikov s pljučnico in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
106	8057	Izmeček	poz	Običajna mešana flora	/	poz	poz	/	Pljučnica
109	8068	Izmeček	neg	<i>E. cloacae</i>	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
110	8069	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i> , MSSA, <i>K. oxytoca</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
118	8115	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
123	8125	Izmeček	neg	<i>K. pneumoniae</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
126	8199	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
132	8255	Izmeček	/	<i>K. pneumoniae</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
135	8329	Aspirat zgornjih dihal	neg	<i>C. albicans</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
137	8332	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	poz	poz	poz	sterilno	Pljučnica
138	8337	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
140	8348	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
141	8498	Aspirat traheje	/	MSSA	neg	neg	/	/	Pljučnica
143	8440	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Pljučnica
144	8439	Izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	poz	/	sterilno	Pljučnica
148	8490	Izmeček	/	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	/	/	Pljučnica
149	8510	Izmeček	neg	MSSA	neg	neg	/	/	Pljučnica
151	8467	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i>	poz	neg	/	sterilno	Pljučnica
159	8660	Izmeček	poz	MSSA	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
161	8691	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
164	8723	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	neg	sterilno	Pljučnica
166	8733	Izpirek bronha – DSR	poz	<i>M. catarrhalis</i>	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
169	8753	Izpirek bronha – LZR	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
170	8755	Izpirek bronha – LGL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
172	8900	Aspirat traheje	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
174	8904	Izmeček	neg	<i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i>	neg	neg	poz	/	Pljučnica
178	9432	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	sterilno	Pljučnica
185	9454	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	poz	neg	/	Pljučnica
188	9469	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	poz	sterilno	Pljučnica
191	104	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	poz	poz	sterilno	Pljučnica
193	108	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
195	127	Izpirek bronha – LB4	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Pljučnica
196	131	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
203	178	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
205	191	Izpirek bronha – LSR	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev bolnikov s pljučnico in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
207	197	Aspirat zgornjih dihal	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
208	202	Izmeček	neg	<i>Candida spp.</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
209	207	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
210	1113	Izmeček	neg	<i>P. mirabilis</i>	/	neg	/	/	Pljučnica
212	1122	Izmeček	šibko poz.	MSSA	/	poz	poz	sterilno	Pljučnica
215	1145	Izmeček	šibko poz.	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	poz	/	Pljučnica
216	1155	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
219	1174	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
224	1924	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
230	1950	Izmeček	šibko poz.	Običajna mešana flora	neg	poz	/	/	Pljučnica
233	1970	Izmeček	šibko poz.	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
235	2004	Izmeček	/	<i>K. pneumoniae</i>	neg	poz	poz	/	Pljučnica
241	2118	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	sterilno	Pljučnica
243	2121	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
247	2127	Izmeček	/	MSSA	neg	neg	neg	/	Pljučnica
248	2128	Izmeček	poz	<i>H. parainfluenzae</i>	neg	poz	neg	sterilno	Pljučnica
249	2141	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
251	2166	Aspirat zgornjih dihal	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
255	2186	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
256	2190	Izmeček	/	<i>K. oxytoca</i>	neg	neg	neg	/	Pljučnica
258	2209	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
259	2210	Izmeček	poz	Običajna mešana flora	neg	poz	poz	/	Pljučnica
263	2232	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	/	neg	/	/	Pljučnica
265	2358	Izmeček	šibko poz.	Običajna mešana flora	neg	poz	neg	<i>S. pneumoniae</i>	Pljučnica
267	2362	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	poz	neg	/	Pljučnica
271	2378	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
276	2402	Izmeček	neg	<i>Candida spp.</i>	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
283	2449	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
286	2622	Izmeček	šibko poz.	<i>Candida spp.</i>	/	neg	neg	<i>S. pneumoniae</i>	Pljučnica
291	2711	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
292	2712	Izmeček	poz	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	neg	sterilno	Pljučnica
293	2715	Izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
294	2716	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
298	2755	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev bolnikov s pljučnico in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
299	2762	Izmeček	neg	MSSA	/	neg	neg	sterilno	Pljučnica
300	2764	Izmeček	poz	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Pljučnica
304	2772	Izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Pljučnica
306	2789	Izmeček	neg	<i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
310	3179	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
311	3181	Izmeček	/	<i>K. pneumoniae</i>	neg	neg	neg	sterilno	Pljučnica
313	3194	Izmeček	poz	Običajna mešana flora	neg	poz	neg	sterilno	Pljučnica

Priloga B: Seznam vzorcev bolnikov z apKOPB in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
7	3559	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i>	/	poz	poz	/	apKOPB
8	3562	Izmeček	/	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	apKOPB
25	4098	Izmeček	/	Običajna mešana flora	/	neg	/	/	apKOPB
26	4101	Izmeček	/	<i>P. aeruginosa</i>	/	neg	/	/	apKOPB
35	4298	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
39	4311	Izmeček	neg	ni rasti	/	neg	neg	/	apKOPB
56	4958	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
61	4988	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
93	8021	Izmeček	neg	<i>M. catarrhalis</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
100	8023	Izmeček	neg	MSSA, <i>B. cepacia</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
101	7995	Izmeček	neg	<i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
102	7996	Izmeček	neg	<i>M. catarrhalis</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
107	8058	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	apKOPB
119	8120	Izmeček	neg	<i>H. parainfluenzae</i> , MSSA	neg	poz	neg	sterilno	apKOPB
121	8101	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
122	8107	Izmeček	neg	<i>E. coli</i>	neg	neg	neg	sterilno	apKOPB
124	8206	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
139	8343	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
146	8486	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	apKOPB
160	8676	Izpirek bronha – Dgl	neg	<i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
163	8722	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	poz	neg	neg	/	apKOPB
165	8729	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	/	sterilno	apKOPB
167	8747	Izmeček	/	<i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
171	8761	Izmeček	neg	<i>E. coli</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
179	9433	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
180	9435	Aspirat tubusa	neg	<i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
183	9452	Izmeček	neg	<i>Pseudomonas putida</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
187	9464	Izpirek bronha – SR	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	apKOPB
192	107	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	poz	/	apKOPB
197	136	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	apKOPB
198	137	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
199	142	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i> , <i>C. koseri</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
201	168	Izmeček	neg	MSSA	neg	neg	neg	/	apKOPB
211	1120	Izmeček	neg	ni rasti	neg	poz	neg	/	apKOPB

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B: Seznam vzorcev bolnikov z apKOPB in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
213	1132	Izmeček	neg	<i>M. catarrhalis</i>	neg	poz	poz	sterilno	apKOPB
217	1160	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
218	1162	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
220	1176	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
234	1994	Izmeček	neg	MSSA	neg	neg	neg	/	apKOPB
237	2016	Izmeček	/	<i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
240	2028	Aspirat tubusa	neg	ni rasti	/	neg	neg	sterilno	apKOPB
246	2124	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	/	/	apKOPB
257	2196	Izmeček	/	Običajna mešana flora	poz	neg	neg	/	apKOPB
260	2216	Izmeček	neg	<i>P. mirabilis</i>	neg	neg	/	/	apKOPB
264	2357	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	poz	poz	sterilno	apKOPB
269	2365	Izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
272	2382	Izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
274	2397	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
275	2401	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
282	2437	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
284	2450	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB
302	2766	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
309	2822	Aspirat traheje	neg	<i>E. coli</i>	/	neg	neg	/	apKOPB
317	3222	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	apKOPB
318	3223	Izmeček	neg	<i>Pseudomonas spp.</i>	neg	neg	neg	/	apKOPB

Priloga C: Seznam vzorcev bolnikov z drugimi boleznimi in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
1		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	poz	neg	sterilno	Ak. bronhitis
3		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Intersticij
11	3628	Izmeček	neg	MSSA, <i>Haemophilus sp.</i>	/	poz	neg	sterilno	Gripa, MSSA pljučnica
12		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	neg	/	/	Pljučna granulomatoza
13		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	neg	/	/	Bronhiolitis, – konstriktivni
14		BAL	neg	/	/	neg	/	/	Pljučna granulomatoza
15		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Intersticij
16		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Pljučna granulomatoza
17		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Ak. bronhitis
18		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	neg	/	/	Intersticij
19		BAL	neg	Običajna mešana flora	/	neg	/	/	Hipersenzit. pnevmonitis
20		BAL	/	Običajna mešana flora	/	neg	/	/	Ak. bronhitis
22	4090	Aspirat tubusa	neg	/	/	neg	/	/	Ak. bronhitis
28		BAL	šibko poz	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Intersticij
29		BAL	neg	<i>S. pneumoniae</i>	neg	neg	/	/	Hamartom
30		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Pljučna granulomatoza
31		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	EABA
32		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Pljučna granulomatoza
33		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Intersticij
34	4297	Aspirat tubusa	neg	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i>	/	neg	neg	/	Fibrotoraks
36	4300	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
37	4302	Aspirat tubusa	neg	Običajna mešana flora	/	neg	/	sterilno	Srč. odpoved
41	4327	Izpirek bronha – LB3	neg	ni rasti	/	neg	/	/	Ca
42	4358	Izpirek bronha – LINGULA	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	KLL
43		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Org. pljučnica
45		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Ca
46		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Bronhiektazije
47		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Srč. odpoved
48		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Intersticij
49		BAL	neg	<i>S. pneumoniae</i>	neg	neg	/	/	Intersticij
50		BAL	neg	Običajna mešana flora	poz	neg	/	/	Intersticij
51		BAL	neg	ni rasti	/	neg	/	/	Intersticij

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: Seznam vzorcev bolnikov z drugimi boleznimi in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
52		BAL	neg	<i>S. pneumoniae</i>	neg	neg	/	/	CREST
53		BAL	neg	ni rasti	/	neg	/	/	Intersticij
54		BAL	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Intersticij
57	4968	Aspirat traheje	neg	<i>H. influenzae</i>	poz	neg	neg	sterilno	Ak. bronhitis
58	4971	Izpirek bronha – LZ	neg	<i>H. parainfluenzae</i>	poz	poz	neg	/	Ca
59	4986	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Plj. embolija
66	5070	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Ak bronhitis
67	5072	Izpirek bronha – DZR	neg	Običajna mešana flora	neg	poz	neg	/	Ca
69	5089	Izmeček	neg	<i>C. freundii</i>	neg	neg	neg	/	Srč. odpoved
70	5091	Izpirek bronha – DSR	neg	MSSA	neg	neg	neg	/	Intersticij
74	5476	Aspirat tubusa	neg	ni rasti	/	neg	neg	/	Plj. fibroza
75	5481	Izmeček	poz	<i>S. pneumoniae</i>	poz	poz	neg	/	Srč. odpoved
76	6079	Aspirat tubusa	neg	<i>Corynebacterium striatum</i>	neg	neg	neg	/	Resp. odpoved
78	6084	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
81	6108	Izpirek bronha – DSR	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ca
82	6605	Izmeček	poz	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Aspergiloza
84	6610	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Astma
85	6620	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Astma
86	6626	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	TB
87	7391	Izmeček	neg	MSSA, <i>B. gladioli</i>	/	neg	neg	/	CF
88	7395	Aspirat zgornjih dihal	neg	ni rasti	/	neg	neg	sterilno	Ak. bronhitis
89	7401	Izpirek bronha – DZR	neg	<i>S. pneumoniae</i> , MSSA, <i>N. meningitidis</i>	poz	neg	neg	/	Intersticij
90	7404	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
91	7405	Izmeček	neg	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>	/	poz	neg	/	Ak bronhitis
92	7408	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	<i>S. epidermidis</i>	TB
94	7983	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ca
95	8005	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Arterijska hipertenzija
96	7981	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
98	7984	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	poz	neg	neg	/	Virusna okužba i.o.
99	8022	Izpirek bronha – DZR	neg	<i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i>	neg	neg	neg	/	Ca
108	8067	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
111	8070	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Srč. odpoved
112	8071	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: Seznam vzorcev bolnikov z drugimi boleznimi in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
113	8083	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ca
114	8084	Izmeček	neg	<i>E. enterogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
115	8086	Izmeček	neg	<i>K. pneumoniae</i>	neg	neg	neg	/	Resp. odpoved
116	8103	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Resp. odpoved
117	8106	Izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Pljučna granulomatoza
120	8105	Izmeček	/	<i>S. maltophilia</i>	neg	neg	neg	/	Resp. odpoved
125	8219	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Astma
127	8211	Izpirek bronha – DZR	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Intersticij
128	8234	Izpirek bronha – DZR	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
129	8220	Izpirek bronha – LZR	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Ak. bronhitis
130	8242	Aspirat tubusa	neg	ni rasti	/	poz	neg	sterilno	Astma
131	8256	Aspirat zaščitnim katetrom	/	ni rasti	/	neg	neg	sterilno	Pljučna granulomatoza
133	8254	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	poz	neg	neg	/	Ak. bronhitis
134	8268	Izmeček	neg	<i>M. catarrhalis</i> , <i>E. coli</i>	neg	poz	neg	/	Srč. odpoved
136	8330	Aspirat zgornjih dihal	/	MSSA	poz	poz	poz	/	Aspiracija
142	8484	Aspirat tubusa	/	Običajna mešana flora	/	neg	/	/	Perforacija požiralnika
145	8519	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Astma
147	8496	Izmeček	/	<i>S. pneumoniae</i>	poz	neg	/	/	Astma
150	8488	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	/	/	Ak. bronhitis
152	8444	Izmeček	neg	<i>A. lwoffii</i>	neg	neg	/	/	Srč. odpoved
153	8468	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ca
154	8513	Izpirek bronha – DB10	neg	<i>E. coli</i>	neg	neg	neg	/	Ca
155	8502	Izpirek bronha – DB2	neg	MSSA	neg	neg	neg	/	Ca
156	8451	Izpirek bronha – LZR	neg	<i>S. viridans</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>Veilonella</i>	neg	neg	neg	/	Ca
157	8497	Izpirek bronha – LZR	/	<i>S. viridans</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>Veilonella</i>	neg	neg	neg	/	Hemoptize
158	8659	Aspirat tubusa	neg	ni rasti	neg	poz	neg	sterilno	TB
162	8707	Izmeček	neg	MSSA, <i>B. gladioli</i>	neg	neg	neg	/	CF
168	8748	Izpirek bronha – DZR	neg	<i>S. viridans</i> , <i>G-bacili</i>	neg	neg	neg	/	Org. pljučnica
173	8902	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	poz	neg	neg	/	Ak. bronhitis
175	8906	Izmeček	neg	KNS	/	neg	neg	/	Ak. bronhitis
176	8907	Izmeček	neg	<i>K. pneumoniae</i>	neg	neg	neg	/	Srč. odpoved
177	8921	Izmeček	neg	<i>N. meningitidis</i>	neg	neg	neg	/	Ca

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: Seznam vzorcev bolnikov z drugimi boleznimi in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
181	9437	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	KNS	Pnevmocistoza
182	9451	Aspirat traheje	neg	ni rasti	/	neg	neg	sterilno	Sarkoidoza
184	9453	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Astma
186	9461	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Limfom
189	100	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	poz	neg		Astma
190	102	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg		Ak. bronhitis
194	117	Izpirek bronha – LGL	neg	<i>S. mitis</i>	/	neg	neg	/	Plevritis
200	156	Izmeček	neg	<i>E. coli</i>	neg	neg	neg	/	Sjogren
202	174	Izmeček	neg	MSSA, <i>parainfluenzae</i> H.	neg	neg	/	sterilno	Ca
204	187	Izpirek bronha – LSR	neg	<i>H. influenzae</i> , <i>S. viridans</i>	/	neg	/	/	Ca
206	193	Izpirek bronha – DSR	neg	<i>Lactobacillus, albicans</i> iz TYO C.	/	neg	neg	/	Org. pljučnica
214	1133	Aspirat tubusa	neg	<i>C. albicans</i>	/	neg	neg	sterilno	Intersticij
221	1193	Izpirek bronha – SR	neg	<i>S. viridans</i> , <i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Ca
222	1199	Izmeček	neg	MSSA	neg	poz	neg	/	CF
223	1202	Aspirat z zaščitnim katetrom – DB3	/	<i>S. viridans</i>	/	neg	neg	sterilno	Intersticij
225	1925	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	sterilno	Malignom
226	1935	Aspirat tubusa	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Intersticij
227	1936	Izmeček	/	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	sterilno	Ak. bronhitis
228	1944	Izmeček	neg	<i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	/	Bronhiektazije
229	1945	Izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ca
231	1954	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i> , <i>K. pneumoniae</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
232	1969	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	sterilno	Ak. bronhitis
236	2007	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ca
238	2017	Izmeček	neg	MSSA, <i>B. gladioli</i>	neg	neg	neg	/	CF
239	2024	Izpirek bronha – DB6	neg	<i>S. mitis</i>	neg	neg	neg	/	Ca
242	2119	Izmeček	neg	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
244	2122	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Odp. srca
245	2123	Izmeček	neg	<i>P. vulgaris</i>	neg	neg	neg	/	Ca
250	2147	Izmeček	neg	<i>M. catarrhalis</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
252	2168	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	poz	neg	neg	/	Ak. bronhitis
253	2172	Aspirat tubusa	neg	ni rasti	/	neg	neg	sterilno	Ak. bronhitis
254	2175	Izmeček	neg	<i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: Seznam vzorcev bolnikov z drugimi boleznimi in rezultati metod, uporabljenih v naši raziskavi

Št. izolata	Prot. št.	Vzorci	BinaxNOW	Kultura	AccuProbe	qPCR	hkratni PCR	HK	Diagnoza
261	2218	Izpirek bronha – LZR	neg	<i>S. viridans</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
262	2224	Izpirek bronha – LB6	neg	<i>S. acidominimus</i> , <i>S. parasanguis</i>	neg	neg	neg	/	Org. pljučnica
266	2361	Izmeček	neg	<i>P. aeruginosa</i>	neg	neg	neg	sterilno	Fibrotoraks
268	2363	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	KLL
270	2370	Izpirek bronha – DZR	neg	MSSA	/	neg	neg	/	Eozin. pljučnica
273	2396	Izmeček	neg	<i>P. mirabilis</i>	neg	neg	neg	<i>S. aureus</i> , <i>P. mirabilis</i>	Ak. bronhitis
277	2414	Izmeček	neg	MSSA	neg	neg	neg	/	CF
278	2422	Izpirek bronha – DB2	neg	<i>S. viridans</i> , <i>S. intermedius</i> , MSSA, <i>H. influenzae</i>	neg	neg	neg	/	Bronhiektazije
279	2425	Izpirek bronha – SR	neg	<i>S. viridans</i> , <i>S. constellatus</i>	neg	neg	neg	/	Intersticij
280	2433	Izmeček	neg	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. viridans</i>	poz	neg	neg	/	Ca
281	2435	Izpirek bronha – DZR	neg	<i>S. viridans</i> , <i>A. lwoffii</i>	neg	neg	neg	/	Org. pljučnica
285	2620	Izpirek bronha – LZR	neg	<i>S. viridans</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>C. freundii</i>	neg	neg	/	/	Ak. bronhitis
287	2626	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Odp. srca
288	2629	Izpirek bronha – LZR	neg	ni rasti	/	neg	neg	/	Intersticij
289	2644	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Gripa
290	2645	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Intersticij
295	2722	Induciran izmeček	/	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Histiocitoza
296	2728	Izpirek bronha – LZR	/	<i>S. intermedius</i> , <i>P. vulgaris</i>	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
297	2731	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	poz	neg	sterilno	Ak. bronhitis
301	2765	Aspirat zaščitnim katetrom – DB10	neg	<i>S. mitis</i> , <i>S. intermedius</i>	neg	neg	neg	/	Embolija
303	2769	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	KOPB
305	2787	Izmeček	neg	<i>Candida spp.</i>	neg	neg	neg	sterilno	Ak. bronhitis
307	2804	Izmeček	neg	MSSA, <i>M. catarrhalis</i>	neg	neg	neg	/	EABA
308	2815	Izmeček	neg	<i>Candida spp.</i>	/	neg	neg	/	Perikardial. izliv
312	3184	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Ak. bronhitis
314	3203	Izmeček	neg	MSSA	neg	neg	neg	/	Ca
315	3205	Izmeček	šibko poz.	<i>H. influenzae</i>	neg	poz	poz	/	Huda astma
316	3215	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	/	neg	neg	/	Plevritis
319	3228	Izmeček	neg	Običajna mešana flora	neg	neg	neg	/	Perikardial. izliv
320	3229	Izpirek bronha – SR	neg	<i>S. viridans</i>	neg	neg	neg	/	Org. pljučnica

Priloga D: Model verjetja, uporabljen v statistični obdelavi

```
{
for(i in 1:N){ # N is the number of individuals
  for(j in 1:K){ # K is the number of classifiers

    # I
    class[j,i] ~ dbern(params[j,diseasepl[i]])
  }
  # Same as disease but with offset 1, instead of 0
  diseasepl[i] <- disease[i]+1
  # Actual disease status ie true classification
  disease[i] ~ dbern(pd)
}
# Distributions of classifier parameters
for(j in 1:K){
  # Parameter for the distribution of the probability of getting a true positive
  params[j,1] ~ dunif(0,params[j,2])
  # Parameter for the distribution of the probability of getting a true negative
  params[j,2] ~ dunif(params[j,1],1)

  # Sensitivity
  sens[j] <- params[j,2]
  # Specificity
  spec[j] <- 1-params[j,1]
}

# Distribution of prevalence
pd ~ dunif(0,1)
}
```